



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**PENGARUH PEMBERIAN BAP DENGAN BEBERAPA
KONSENTRASI KINETIN TERHADAP MULTIPLIKASI TUNAS
TANAMAN KINA (CINHONA LEDGERIANA MOENS) SECARA IN
VITRO**

SKRIPSI



**ERVIANA EKA PRATIWI
1010212014**

**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2014**

**PENGARUH PEMBERIAN BAP DENGAN BEBERAPA
KONSENTRASI KINETIN TERHADAP MULTIPLIKASI
TUNAS TANAMAN KINA (*Cinchona ledgeriana* Moens)
SECARA *IN VITRO***

OLEH

**ERVIANA EKA PRATIWI
1010212014**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Pertanian**

**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS SANDALAS
PADANG
2014**

**PENGARUH PEMBERIAN BAP DENGAN BEBERAPA
KONSENTRASI KINETIN TERHADAP MULTIPLIKASI
TUNAS TANAMAN KINA (*Cinchona ledgeriana* Moens)
SECARA *IN VITRO***

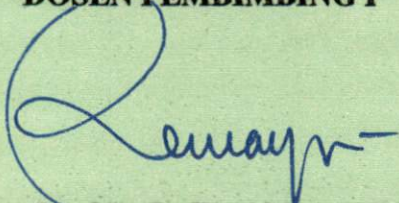
SKRIPSI

OLEH

**ERVIANA EKA PRATIWI
1010212014**

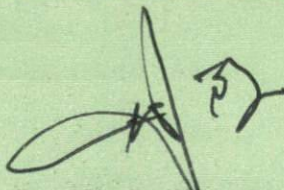
MENYETUJUI

DOSEN PEMBIMBING I



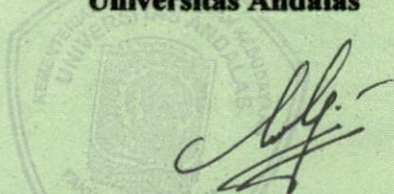
Prof. Dr. Ir. Reni Mayerni, MP
NIP. 196605111990032001

DOSEN PEMBIMBING II



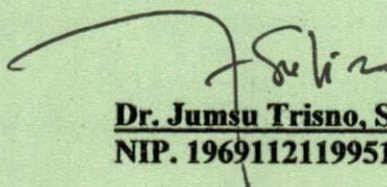
Prof. Dr. Ir. Warnita, MP
NIP. 196401011989112001

**Dekan Fakultas Pertanian
Universitas Andalas**



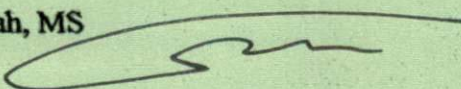

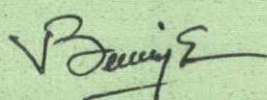

Prof. Ir. H. Ardi, MSc
NIP. 195312161980031004

**Ketua Program Studi
Agroteknologi Fakultas Pertanian
Universitas Andalas**



Dr. Jumsu Trisno, SP, M.Si
NIP. 196911211995121001

Skripsi ini telah diuji dan dipertahankan di depan Sidang Panitia Ujian Sarjana
Fakultas Pertanian Universitas Andalas, pada tanggal 7 Mei 2014

No	Nama	Tanda tangan	Jabatan
1.	Prof.Dr.Ir. Irfan Suliansyah, MS		Ketua
2.	Dra. Netti Herawati, MSc		Sekretaris
3.	Dr.Ir. Benni Satria, MP		Anggota
4.	Prof.Dr.Ir. Reni Mayerni, MP		Anggota
5.	Prof.Dr.Ir. Warnita, MP		Anggota



Setapak langkah telah ku ayunkan hanya dengan rahmat ALLah SWT serta keyakinan
Kini.....

Secercah harapan dan sepenggal keberhasilan telah ku gapai semoga menjadi pelita untuk
meraih harapan yang masih tersisa. Tanpa mengurangi rasa syukur kepada-Mu Ya
ALLAH. Terimalah persembahkan karya kecil yang berarti besar bagiku untuk kedua orang
tuaku Ibunda Memizesmita, SP dan Ayahanda Ir. S. Joko Purwanto terima kasih atas
kasih sayangnya yang tak terhingga, doa dan restu yang mengiringi setiap langkahku,
ketabahan, keikhlasan serta kerja keras mama dan papa. Tanpa mama papa, ovie tidak berarti
apa-apa. Untuk Keluarga besar tercinta: adikku Fikra Tri Novianti, nenekku Hj.
Yusnar Jamal, Om dan Tante (Dr. Jendrius dan Dr. Mulyanti, Revolisma, Hj.
Revodiana, Doni Hendrik Msi dan dr. Nehmi Silvia, serta Yunpelizar, SE dan
Nurfaizah,) yang telah memberikan doa, dorongan serta semangat dan terima kasih atas
segala bantuan dan fasilitas yang telah diberikan dalam menyelesaikan skripsi ini.

Untuk teman-teman yang telah rela mendengarkan curhatan
dan tangisan disaat suka maupun duka, terima kasih untuk
bantuan yang telah diberikan selama ini (Nurul, Sarah,
Aulia, Rita, Yudha, Vivi, Yutri, Niky, Ima, Mita,
Frisca) serta teman2 Agroteknologi'10. Terima kasih
untuk tim Tissue Culture Laboratory (Bu Aisyah, Kak
Yet, Bg Ican, Kak Lara, Gefri, Kak Dahlia, Kak
Desi, Andika) dan ungkapan terakhir kuucapkan untuk
seseorang yang banyak berperan dalam pelaksanaan
penelitian ini, yang rela menemani disaat susah maupun
senang (Anton Suhernan, SP)

Semoga keberhasilan yang telah ku peroleh merupakan langkah awal yang baik dalam
mengemban tanggung jawab yang lebih besar
Amin.....

BIODATA

Penulis dilahirkan di Lubuk Sikaping Sumatera Barat pada tanggal 1 Februari 1993 sebagai anak pertama dari dua bersaudara. Dilahirkan dari pasangan Bapak Ir. S. Joko Purwanto dan Ibu Memizesmita, SP. Pendidikan Taman Kanak-kanak (TK) ditempuh di TK Mekar Melati Wisma Indah V Padang (1997-1998). Pendidikan Sekolah Dasar (SD) ditempuh di SD N 18 Kinali (1998-2004). Sekolah Menengah Pertama (SMP) ditempuh di Boarding School Islam Assalaam Surakarta (2004-2006) dan diselesaikan di MTs N 1 Lubuk Sikaping (2007). Sekolah Menengah Atas (SMA) ditempuh di SMA N 1 Kinali lulus tahun 2010. Pada tahun 2010 penulis diterima di Fakultas Pertanian Universitas Andalas Program Studi Agroekoteknologi Bidang Kajian Agronomi.

Padang, Mei 2014

E.E.P

KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas berkat, rahmat, taufik dan hidayah-Nya, dan salawat beserta salam untuk Nabi Muhammad SAW sebagai teladan dalam menjalani kehidupan ini. Penyusunan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Pemberian BAP Dengan Beberapa Konsentrasi Kinetin Terhadap Multiplikasi Tunas Tanaman Kina (*Cinchona ledgeriana* Moens) Secara *In Vitro*”** dapat diselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa dalam proses penulisan skripsi ini banyak mengalami kendala, namun berkat bantuan, bimbingan, kerjasama dari berbagai pihak dan berkah dari Allah SWT sehingga kendala-kendala yang dihadapi tersebut dapat diatasi. Untuk itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan kepada Ibu **Prof. Dr. Ir. Reni Mayerni, MP** selaku pembimbing I dan Ibu **Prof. Dr. Ir. Warnita, MP** selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, motivasi, arahan, dan saran-saran yang sangat berharga kepada penulis selama menyusun skripsi. Terima kasih juga penulis ucapkan kepada Bapak **Prof. Dr. Ir. Irfan Suliansyah, MS**, **Dr. Ir. Benni Satria, MP**, **Ir. Yusrizal M. Zen, MS** dan Ibu **Dra. Netti Herawati, MSc** yang telah banyak memberikan saran-saran dan pengarahan untuk penulisan skripsi ini.

Selanjutnya ucapan terima kasih penulis sampaikan pula kepada Dekan Fakultas Pertanian dan Ketua Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas beserta staf dan pengajar yang telah turut memberikan bantuan dalam pelaksanaan penelitian.

Penulis menyadari masih terdapat kekurangan pada skripsi ini, sehingga penulis mengharapkan adanya saran dan kritik yang bersifat membangun demi kesempurnaan skripsi ini.

Padang, Mei 2014

E.E.P

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
ABSTRAK.....	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	5
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Tanaman Kina.....	6
B. Kultur Jaringan.....	8
C. Lingkungan Kultur.....	9
D. Eksplan.....	9
E. Media.....	10
F. Zat Pengatur Tumbuh.....	11
BAB III BAHAN DAN METODA.....	13
A. Waktu dan Tempat.....	13
B. Alat dan Bahan.....	13
C. Rancangan Percobaan.....	13
D. Pelaksanaan Penelitian.....	14
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	18
A. Persentase Eksplan Hidup (%).....	18
B. Saat Muncul Tunas (HST).....	19
C. Persentase Eksplan Membentuk Tunas (%).....	21
D. Jumlah Tunas Per Eksplan (buah).....	22
E. Tinggi Tunas (cm).....	24
F. Jumlah Daun (helai).....	26
G. Bobot Segar Shootlet (g).....	28
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	30
A. Kesimpulan.....	30
B. Saran.....	30
DAFTAR PUSTAKA.....	31
LAMPIRAN.....	36

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Kandungan alkaloid dari beberapa spesies kina	7
2. Kandungan alkaloid kina ledger	7
3. Persentase eksplan hidup umur 12 MST pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin	18
4. Saat muncul tunas pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin	20
5. Persentase eksplan membentuk tunas umur 12 MST pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin	21
6. Jumlah tunas per eksplan umur 12 MST pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin	23
7. Tinggi tunas umur 12 MST pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin	24
8. Jumlah daun umur 12 MST pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin	27
9. Bobot segar shootlet umur 12 MST pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin	29

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Eksplan yang mengalami mati dan <i>browning</i> (A), eksplan yang hidup hingga 12 MST (B)	19
2. Tunas muncul pada kina <i>ledger</i>	20
3. Pertumbuhan jumlah tunas kina <i>ledger</i> pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin dari 1-12 MST	24
4. Pertumbuhan tinggi tunas kina <i>ledger</i> pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin dari 1-12 MST	26
5. Pertumbuhan jumlah daun kina <i>ledger</i> pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin dari 1-12 MST	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Jadwal Kegiatan	36
2. Komposisi Media Basal <i>Murashige and Skoog</i> (MS)	37
3. Pembuatan Larutan Stok Media MS	38
4. Perhitungan ZPT (Zat Pengatur Tumbuh)	42
5. Denah Penempatan Botol Kultur di Laboratorium menurut RAL	44
6. Tabel Analisis Ragam Beberapa Pengamatan	45
7. Dokumentasi Hasil Percobaan	47
8. Karakteristik Tanaman Kina <i>Ledger</i> (<i>Cinchona ledgeriana</i> Moens)	48
9. Jumlah tunas yang terbentuk umur 4,8,12 MST pada pemberian BAP dengan beberapa konsentrasi kinetin	49
10. Tinggi tunas yang terbentuk umur 4,8,12 MST pada pemberian BAP dengan beberapa konsentrasi kinetin	50
11. Jumlah daun yang terbentuk umur 4,8,12 MST pada pemberian BAP dengan beberapa konsentrasi kinetin	51

PENGARUH PEMBERIAN BAP DENGAN BEBERAPA KONSENTRASI KINETIN TERHADAP MULTIPLIKASI TUNAS TANAMAN KINA (*Cinchona ledgeriana* Moens) SECARA *IN VITRO*

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pemberian BAP dengan konsentrasi kinetin yang tepat terhadap multiplikasi tunas tanaman kina secara *in vitro*. Percobaan dilaksanakan pada bulan Desember 2013 sampai Maret 2014 di Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Budidaya Pertanian, Universitas Andalas, Padang. Percobaan ini disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari lima taraf perlakuan dan empat ulangan. Data hasil percobaan ini dianalisis menggunakan uji F dan jika uji F hitung perlakuan berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) pada taraf nyata 5%. Percobaan ini meliputi pemberian BAP 3 mg/l dengan lima taraf konsentrasi kinetin yaitu 0; 0,5; 1; 1,5 dan 2 mg/l. Dari hasil percobaan didapatkan bahwa pemberian BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l merupakan perlakuan yang terbaik pada respon saat muncul tunas tercepat 5,92 HST (Hari Setelah Tanam), jumlah tunas terbanyak 15,41 buah, tinggi tunas tertinggi 3,25 cm, membentuk jumlah daun terbanyak 61,75 helai dan bobot segar shootlet tertinggi 0,70 g tanaman kina *ledger* pada umur 12 MST (Minggu Setelah Tanam).

Kata kunci : BAP, kinetin, kultur jaringan

EFFECT OF BENZYL AMINO PURINE AT VARIOUS CONCENTRATIONS OF KINETIN ON PRODUCTION OF QUININE (*Cinchona ledgeriana* Moens) SHOOTS *IN VITRO*

Abstract

This experiment, to determine the best concentration of kinetin for production of quinine shoots *in vitro*, was conducted from December 2013 to March 2014 in the Tissue Culture Laboratory, Department of Agriculture, Andalas University, Padang . The experiment was based on a completely randomized design consisting of five treatments and four replications. Data were analyzed using the F test and if the difference was significantly different at 5% level, then Duncan 's New Multiple Range Test was used also at the 5% significance level. Benzyl amino purine at 3 mg/l was used with 0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg/l kinetin. The administration of Benzyl amino purine (3 mg/l) with kinetin (0.5 mg/l) was the best treatment as seen from the time to first shoot appearance (5.9 days after planting), the number of shoots (15.4), the shoot height (3.3 cm), the number of leaf blades (61.5) and fresh weight of the shootlets (0.7 g) 12 weeks after planting.

Key words: BAP, kinetin, tissue culture

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tanaman kina (*Chincona* spp) merupakan salah satu tanaman penghasil bahan baku industri. Kina digunakan sebagai bahan baku industri farmasi, kosmetika, makanan dan minuman (Kusman, 1983). Tanaman kina menghasilkan alkaloid kuinolin utama yang terdapat pada kulit batang kina yaitu berupa kinin, kinidin, sinkonin dan sinkonidin. Empat jenis alkaloid tersebut mempunyai nilai ekonomi yang tinggi. Menurut Dayrit *et al* (1994), kinin merupakan bahan aktif obat anti malaria, dan kinidin sebagai obat penyakit jantung.

Menurut Maudy dan Risma (1992), kina kembali menarik perhatian dunia setelah lama dilupakan perannya sebagai obat malaria karena digantikan oleh obat-obat sintetik. Selain obat anti malaria kinin juga digunakan sebagai bahan tonik, obat influenza, dan intermediate dalam pembuatan vitamin B (Arifin *et al*, 1995).

Arifin *et al* (1995), menyatakan pada tahun 1939 Indonesia merupakan pemasok 90% kebutuhan kina dunia dengan luas areal tanam 17.000 ha dengan produksi 11.000 ton kulit kering per tahun. Akibat terlantarnya kebun kina dengan terjadinya penebangan secara besar-besaran sejak perang dunia II sampai tahun 1960-an areal produksi kina semakin menurun, tetapi kebutuhan kina semakin meningkat.

Kebutuhan dunia akan kinin dan kinidin dewasa ini sebesar 600 ton garam kina per tahun yang terdiri dari derivat kinin sebesar 400 ton dan kinidin sebesar 200 ton, namun Indonesia hanya mampu memenuhi 250 ton garam kina. Disamping itu, luas areal tanaman kina di Jawa Barat dalam kurun waktu 5 tahun terakhir cenderung terus menurun. Data areal tanaman kina di Jawa Barat hingga tahun 2013 tinggal sekitar 3.150 ha. Ini terbagi di sentra produksi utama tanaman kina nasional di PTPN VIII total sekitar 3.000 hektare serta PT Kimia Farma Perkebunan Bintang sekitar 150 ha (Rosyadi, 2013).

Tanaman kina tumbuh baik pada suhu udara yang berkisar antara 13,5° C hingga 21° C. Dalam bulan terdingin suhu minimum harian rata-rata 12° C, sedangkan dalam bulan terpanas suhu maksimum harian rata-rata 21,6° C. Kelembaban relatif harian minimum dalam satu tahun 68 % dan maksimum 97 %.

Tanaman kina cocok ditanam didaerah yang memiliki curah hujan yang merata disepanjang tahun dengan hujan tahunan 2000-3500 mm, pada ketinggian 900-3000 m diatas permukaan laut. Di Indonesia perkebunan kina terdapat di Jawa dan Sumatera pada ketinggian 900-2000 m dpl. Sedangkan pH optimum untuk pertumbuhan tanaman kina 5,8 dan mengandung bahan organik (Arifin *et al*, 1995).

Setiap jenis kina mempunyai kadar alkaloid kinin yang berbeda. *C. Ledger* merupakan jenis kina yang banyak memiliki kandungan alkaloid kinin. Moens (1872) menyatakan dalam Groothoff (2006), bahwa kina ledger tidak saja unggul dengan kadar kinin yang tinggi, tetapi alkaloid ini sangat mudah dipisahkan sebagai sulfat murni dibandingkan dengan kulit-kulit dari jenis kina lainnya, yang menurutnya disebabkan oleh kecilnya jumlah alkaloid sampingan. Pada tahun 1913, dari Jawa diekspor lebih dari 7.000.000 kg kulit kina ledger diantaranya 850.000 kg dalam bentuk kinin sulfat. Dibandingkan dengan permintaan ekspor kina succi tidak lebih dari 600.000 kg. Sebagian kulit-kulit kina succi itu terdiri atas kulit akar yang bersal dari klon ledger yang berbatang bawah succi.

Menurut Madjid (1975), bahwa Indonesia berpotensi untuk pengembangan perkebunan kina karena keadaan iklim dan tanah yang cocok, yaitu di Jawa Barat dan Sumatera Barat. Sumatera Barat merupakan daerah produksi tanaman kina kedua setelah Jawa Barat. Menurut sejarahnya ketika sebelum perang dunia II, terdapat empat kebun yang ditanami kina secara monokultur dan lima kebun secara bikultur dengan tanaman teh. Perhatian pengusaha terhadap komoditi kina baru muncul sekitar tahun 1964/1965, karena saat itu harga komoditi kina menguntungkan. Kebanyakan dari pengusaha tersebut sekedar untuk mendapatkan hasil tanpa adanya replanting dan newplanting sehingga produksi dan luas areal tanaman kina berkurang setiap tahun.

Menurut Santoso (2013) direktur utama PT. Sinkona Indonesia Lestari (SIL), kemampuan produksi garam kina Indonesia ditingkatkan kembali sampai 150 ton/tahun untuk memperkuat kembali pemasaran komoditas kina di dunia. Tujuan revitalisasi kemampuan produksi garam kina nasional, juga berkaitan dengan daya saing terhadap produk impor garam kina. Sekaligus pula upaya kebangkitan kembali kina Indonesia, khususnya Jawa Barat yang dimasa lalu

merupakan produsen utama garam kina dunia. Sampai kini kebutuhan garam kina diutamakan untuk produksi farmasi dan *beverages*.

Dengan adanya upaya revitalisasi untuk meningkatkan adalah melalui perluasan areal dan peremajaan tanaman. Menurut Riyadi dan Tahardi (2005), perbanyakan tanaman kina secara konvensional biasanya dilakukan melalui, setek, sambung dan okulasi. Namun penyediaan bibit melalui cara setek mengalami kesulitan dalam menginduksi perakaran, sedangkan melalui teknik okulasi dan sambungan harus memiliki kesesuaian antara batang bagian bawah dan bagian atas. Selain itu memerlukan batang bagian bawah dalam jumlah yang banyak untuk melakukan perbanyakan.

Wibowo *et al* (1990), menyatakan bahwa perbanyakan tanaman kina dengan cara penyambungan memerlukan waktu yang cukup lama yaitu 8-12 bulan sebelum bahan tanam dipindahkan ke lapangan. Untuk mengatasi permasalahan tersebut, dapat dilakukan upaya perbanyakan tanaman kina melalui teknik kultur jaringan dengan perbanyakan somaklonal atau mikropropagasi.

Kultur jaringan merupakan salah satu cara perbanyakan tanaman secara vegetatif. Kultur jaringan merupakan teknik perbanyakan tanaman dengan cara mengisolasi bagian tanaman seperti daun, mata tunas, serta menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan secara aseptik yang kaya nutrisi dan zat pengatur tumbuh dalam wadah tertutup yang tembus cahaya sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri dan bergenerasi menjadi tanaman lengkap. Prinsip utama dari teknik kultur jaringan adalah perbanyakan tanaman dengan menggunakan bagian vegetatif tanaman menggunakan media buatan yang dilakukan di tempat steril.

Media merupakan faktor penentu dalam perbanyakan dengan kultur jaringan. Komposisi media yang digunakan tergantung dengan jenis tanaman yang akan diperbanyak. Media kultur yang baik seharusnya menyediakan unsur hara baik makro maupun mikro, sumber vitamin dan asam amino, sumber karbohidrat, zat pengatur tumbuh yang dapat menyokong pertumbuhan dari eksplan tanaman, bahan pematat seperti agar dan *gelrite* dan juga menyediakan arang aktif untuk kasus tertentu pada tanaman. Menurut Lestari (2008), media dasar MS banyak digunakan baik untuk kultur media padat maupun pada kultur suspensi dalam

media cair. Keistimewaan media dasar MS adalah kandungan nitrat, kalium dan amoniumnya yang tinggi (Gamborg, 1991 dalam Lestari, 2008). Wetherell (1982) menyatakan bahwa satu atau lebih hormon tanaman yang ditambahkan kedalam media dapat merangsang terjadinya pertumbuhan dan atau pengaturan pertumbuhan, sehingga terjadinya kontak antara jaringan tanaman dengan media dan juga dengan udara.

Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan faktor yang menentukan dalam teknik kultur jaringan, salah satunya sitokinin. Sitokinin berperan dalam mendorong pertumbuhan sel dan jaringan serta inisiasi pembentukan tunas. Beberapa jenis sitokinin yang digunakan dalam kultur jaringan ialah BAP, kinetin, 2-ip. Menurut Dodds dan Roberts (1995) bahwa BAP dan kinetin merupakan sitokinin sintetis, sedangkan 2-ip termasuk sitokinin alami yang mirip dengan zeatin. Arteca (1996) menyatakan bahwa BAP bersifat stabil, relatif lebih murah dibandingkan dengan jenis sitokinin lainnya, tersedia cepat dan sangat efektif.

Menurut Purwaningsih (2003), penggandaan tunas terbanyak dan terbaik diperoleh dari pemberian BAP 3 mg/l pada media MS untuk *C. ledgeriana* dan *C. Succirubra*. Riyadi dan Tahardi (2009) menyatakan bahwa tingkat multiplikasi tunas aksiler lebih tinggi dari pada tunas apikal. Multiplikasi tunas aksiler menghasilkan jumlah tunas rata-rata tertinggi sebesar 24.6 tunas per eksplan pada perlakuan BA 3 mg/l, sedangkan multiplikasi tunas apikal tertinggi sebesar 17.2 mg/l tunas per eksplan pada perlakuan BA 5 mg/l pada umur delapan minggu.

Syahid (2007) menyatakan bahwa terdapat interaksi antara asal kalus tanaman keladi tikus dengan beberapa taraf konsentrasi BA (Benzil Adenin) terhadap banyaknya tunas dan daun yang terbentuk, dimana jumlah tunas dan daun terbanyak diperoleh pada perlakuan asal kalus 2,4 D 1,0 mg/l+kinetin 0,3 mg/l kombinasi dengan BA 0,3 mg/l sebanyak 13,2 tunas dan 4,4 helai daun. Lestari (1991) menyatakan bahwa pada tanaman rami penggunaan BA 0,5 mg/l dan BA 0,3 mg/l dapat membentuk tunas dengan jumlah yang banyak yaitu 6,11 dan 5,56. Sedangkan penggunaan kinetin 0,3 mg/l membentuk tunas sebanyak 5,56 dan kinetin 0,1 dan 0,5 mg/l membentuk tunas sebanyak 3 dan 2,22 yang tidak berbeda nyata satu sama lain.

Menurut Hartman *et al* (1990), penggunaan zat pengatur tumbuh dari golongan yang sama pada waktu yang bersamaan pada sebagian tanaman nyata lebih baik dibandingkan penggunaan tunggal. Lestari (2008) menyatakan dengan manipulasi formulasi media dasar dan zat pengatur tumbuh dapat mengoptimalkan aktivitas pembelahan sel untuk multiplikasi tunas. Berdasarkan hal tersebut penulis telah melakukan penelitian tentang “Pengaruh Pemberian BAP Dengan Beberapa Konsentrasi Kinetin Terhadap Multiplikasi Tunas Tanaman Kina (*Cinchona ledgeriana* Moens) Secara *In Vitro*”.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang diuraikan di atas, maka dapat dirumuskan masalah yaitu apakah pemberian BAP dengan beberapa konsentrasi kinetin yang berbeda memberikan pengaruh terhadap multiplikasi tunas pada tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* Moens) secara *In Vitro*?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pemberian BAP dengan beberapa konsentrasi kinetin yang tepat terhadap multiplikasi tunas tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* Moens) secara *In Vitro*.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini ialah diketahui pemberian BAP dengan konsentrasi kinetin yang tepat dalam multiplikasi tunas tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* Moens) secara *In Vitro*

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Kina

Kina (*Chincona* sp) merupakan tanaman tahunan yang berasal dari pegunungan Andes Amerika Serikat. Tanaman ini kemudian tersebar ke berbagai negara di Eropa dan Asia. Introduksi tanaman kina di Indonesia dimulai di pulau Jawa pada abad pertengahan ke-19 oleh pemerintah Belanda, Burba tahun 1999 *cit* Purwaningsih (2003).

Ada berbagai spesies tanaman kina, diantaranya *Cinchona lancifolia*, *Cinchona trianae*, *Cinchona cordofolia*, *Cinchona succirubra*, *Cinchona officinalis*, *Cinchona micranta*, *Cinchona coloptera*, *Cinchona josephiana*, *Cinchona pahudiana*, *Cinchona calisaya* dan *Cinchona ledgeriana*, Motley (1997) *cit* Purwaningsih (2003). Spesies tanaman kina yang telah dikembangkan di Indonesia adalah *C. Succirubra* dan *C. Ledgeriana* (Astika dan Adimulyo, 1977).

Genus *Cinchona* merupakan perdu yang senantiasa hijau dengan daun-daun tunggal yang saling berhadapan (berpasangan) dan bersilang, bertepi halus, bertangkai, urat tengah kukuh dan kuat sedangkan urat cabang sangat banyak. Bentuk daun berkisar dari bulat sampai bentuk lanset, beberapa diantaranya berbulu. Pada ketiak cabang primer beberapa diantaranya terdapat scrobikuli dan ada yang mempunyai rambut-rambut kaku. Pada pucuknya terdapat daun penumpu yang tumbuh menjadi satu dan cepat gugur. Bunga terdiri atas bakal buah, daun kelopak, tajuk yang berbentuk tabung, dengan pinggir tajuk berlekuk lima, berbau harum. Buah berbentuk kotak, lonjong memanjang, dapat membelah dengan dua katup, berisi sekitar 25 biji yang pipih dengan sayap tipis disekelilingnya dan berbentuk perisai. Biji sangat kecil dan ringan, panjangnya berkisar antara 1,75-3,25 mm dan lebarnya 1,5-2 mm (Arifin *et al*, 1995).

Di Indonesia, tanaman kina tumbuh dengan baik pada daerah terbuka. Tanaman kina tumbuh subur pada tanah vulkanik muda, kaya akan humus, berstruktur remah dengan pH berkisar antara 4,6-6,5 dan pH optimal 5,8. Kandungan udara tanah yang baik bagi pertumbuhan tanaman berkisar antara 27-30 %, sedangkan kadar air tanah yang diperlukan tanaman sekitar 50 % sehingga tanaman tidak mudah mengalami kekeringan. Tanaman kina tumbuh baik pada

ketinggian antara 1.400-1.700 m dpl. Suhu daerah penanaman berkisar antara 13,5-21,1° C. Curah hujan yang diperlukan berkisar antara 2.000-3.000 mm/tahun dan tersebar merata sepanjang tahun. Kelembaban udara berkisar antara 68-97% dengan rata-rata 81% (Sukasmono, 1988). Di Indonesia perkebunan kina terdapat di Jawa dan Sumatera pada ketinggian 900-2.000 m dpl (Arifin *et al*, 1995). Sedangkan untuk kina ledger dapat tumbuh dengan cepat dan berbunga sebelum waktunya pada ketinggian 1.000 m dpl.

Cinchona ledgeriana menghasilkan kulit kina yang produktif, yaitu kulit kina dengan kadar garam kinin yang bernilai tinggi. Tanaman ini mempunyai kulit yang tebal, berbeda dengan jenis lain dan sangat kaya akan alkaloid, terutama kinin. Kulit akar juga memiliki kandungan kinin yang relatif tinggi (Ettling, 2006)

Hasil penelitian Moens (1872) dalam Groothoff (2006), menyatakan kandungan alkaloid dari tanaman *Cinchona ledgeriana* memiliki kandungan kinin, kinin sulfat, kinidin dan total alkaloid tertinggi diantara spesies lainnya seperti yang tertera pada Tabel 1, kemudian Moens menganalisis kembali beberapa sampel kandungan alkaloid kina ledger dan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Kandungan alkaloid dari beberapa spesies kina

Spesies	Kinin (%)	Kinin sulfat (%)	Kinidin (%)	Total Alkaloid (%)
<i>C. ledgeriana</i>	5,53	7,44	0,43	7,25
<i>C. calisaya</i>	2,32	3,11	0,63	4,88
<i>C. hasskarliana</i>	1,23	1,65	1,24	4,04

Tabel 2. Kandungan alkaloid kina ledger

Kinin (%)	Kinin sulfat (%)	sinkonidin (%)	Kinidin (%)	Sinkonin (%)	Amorf (%)	Total (%)
10,90	14,67	1,25	0	0,44	1,72	14,31
7,49	10,08	Sedikit	0	-	1,41	8,90

Kina ledger mempunyai daun berbentuk lonjong memanjang dan lancip. Panjang daun adalah 25 cm dan lebar 10 cm serta mempunyai tangkai yang pendek. Pada dahan yang kurang baik pertumbuhannya, daun-daunnya menjadi kecil. Bunga kina berwarna kuning keputih-putihan dan menyebarkan bau wangi

yang tajam. Biji yang tua panjang sayapnya 4,5 mm dan lebarnya 1 mm. Dalam 1 kg biji terdapat kurang lebih 3,5 juta biji (Groothoff, 2006).

B. Kultur Jaringan

Kultur jaringan merupakan suatu teknik perbanyakan yang kini telah dimanfaatkan secara komersial. Menurut Gunawan (1992) bahwa kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, kelompok sel, jaringan dan organ serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan bergenerasi menjadi tanaman utuh kembali.

Tujuan utama perbanyakan tanaman secara *in vitro* meliputi produksi *planlet* dari tanaman yang sulit diperbanyak melalui biji, perbanyakan klonal *planlet* yang identik secara genetika, produksi bahan tanaman bebas virus dan perbaikan tanaman melalui modifikasi genetik (Torres, 1989). Gunawan (1992) menyatakan bahwa tujuan kultur jaringan adalah untuk memproduksi tanaman dalam jumlah besar, waktu yang singkat terutama untuk varietas-varietas unggul yang baru dihasilkan serta memperoleh tanaman yang bebas dari patogen.

Pelaksanaan teknik kultur jaringan memiliki beberapa tahapan yaitu : tahap persiapan, tahap inisiasi kultur, tahap multiplikasi tunas, tahap pemanjangan tunas, inisiasi akar dan perkembangan akar, serta aklimatisasi (Werbrouds dan Debergh, 1993).

Perbanyakan tanaman melalui teknik kultur jaringan umumnya dilakukan dengan perbanyakan klonal yang menggunakan eksplan dari bagian meristem aksilar. Penggunaan meristem aksilar dapat menghasilkan multiplikasi tunas aksilar secara cepat, sehingga bibit yang dihasilkan dalam jumlah besar dapat ditempuh dalam waktu yang relatif singkat. Secara alami pertumbuhan dan jumlah tunas aksilar dibatasi oleh keberadaan tunas apikal yang dikenal dengan dominansi apikal. Rani dan Raina (2000) menyatakan bahwa meniadakan dominansi tunas apikal tersebut dapat menghasilkan multiplikasi tunas aksilar secara cepat.

Regenerasi tanaman melalui meristem aksilar menjamin bibit yang *true to type* dan mempunyai resiko kecil yang mengarah ketidakstabilan genetik (Cassells dan Curry, 2001). Sel-sel meristem pada bagian tersebut umumnya

stabil, karena mitosis pada sel-sel meristem terjadi bersama dengan pembelahan sel yang berkesinambungan sehingga ekstra duplikasi DNA dapat dihindarkan. Hal ini menyebabkan tanaman yang dihasilkan identik dengan tanaman induknya.

C. Lingkungan Kultur

Oksigen, suhu dan cahaya adalah tiga faktor lingkungan yang turut mempengaruhi pertumbuhan suatu kultur. Kebutuhan oksigen pada kultur, terutama pada embrio kadang-kadang lebih tinggi pada konsentrasi oksigen di atmosfer (Pierik, 1987). Menurut Gunawan (1992), kondisi yang paling utama adalah suhu dan cahaya. Suhu menentukan respons fisiologi kultur dan kecepatan pertumbuhan. Dalam kultur jaringan unsur-unsur cahaya seperti kualitas cahaya, panjang (lama) penyinaran dan intensitas cahaya sangat perlu diperhatikan karena sangat berperan dalam pengendalian perkembangan (morfogenesis) eksplan. Wetherell (1982) menyatakan bahwa penyinaran yang baik adalah menggunakan gabungan lampu fluoresen putih yang dingin dengan kekuatan penyinaran 100-400 ft-C (1.000-4.000 lux), dikombinasikan dengan lampu biasa sebanyak 30 % dari jumlah Watt seluruh penerangan.

Suhu rata-rata untuk kultur *in vitro* umumnya lebih tinggi dibandingkan suhu untuk pertumbuhan *in vitro* dari tanaman yang sama. Kebanyakan suhu ruang inkubasi dalam kultur *in vitro* diatur sama baik siang maupun malam. Pada banyak tanaman jaringannya tumbuh baik pada 17°C sampai 32°C. Beberapa peneliti ada yang menggunakan suhu ruang inkubasi yang disesuaikan dengan suhu alami tempat tumbuh tanaman tersebut secara *in vitro*, pada siang hari diberikan suhu lebih tinggi dari rata-rata dan pada malam hari lebih rendah 6°C sampai 8°C (Wattimena *et al*, 1992).

D. Eksplan

Menurut Gunawan (1988), eksplan merupakan bagian tanaman yang digunakan untuk perbanyakan tanaman dalam kulturisasi. Eksplan yang baik memiliki syarat berupa bebas dari organisme lain, memiliki potensi regenerasi dan pertumbuhan yang tinggi.

Menurut Wattimena *et al* (1992), pucuk yang berisi meristem dan jaringan dibawahnya lebih mudah diisolasi. Ukuran pucuk yang digunakan

menentukan kebersihan pengkulturan. Umumnya ukuran eksplan yang digunakan berkisar 0,5-1 cm. Pucuk dengan ukuran lebih besar lebih tahan dipindahkan dalam kondisi *in vitro*, pertumbuhan lebih cepat dan menghasilkan lebih banyak mata tunas aksilar, namun kelemahan menggunakan eksplan dengan ukuran lebih besar sulit untuk mendapatkan kultur yang aseptik dan membutuhkan bahan tanaman yang lebih banyak.

E. Media

Salah satu faktor penentu keberhasilan perbanyakan kultur jaringan, yaitu media kultur. Berbagai komposisi media kultur telah diformulasikan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang dikulturkan (Yusnita, 2003). Wetherell (1982) menyatakan bahwa media kultur yang memenuhi syarat adalah media yang mengandung nutrisi makro dan mikro dalam kadar dan perbandingan tertentu, serta sumber energi yang umumnya menggunakan sukrosa. Media kultur sering juga mengandung vitamin dan zat perangsang pertumbuhan. Kadang diperlukan penambahan zat lain seperti *yeast*, ekstrak *malt* atau cairan tanaman sebagai sumber zat perangsang pertumbuhan.

Menurut Hartman *et al* (1990) bahwa media dasar yang digunakan untuk kultur jaringan harus diseleksi melalui analisis yang sistematis. Media Murashige dan Skoog (MS) merupakan media yang telah digunakan secara luas, khususnya pada tanaman herbaceous karena tingginya kandungan nitrogen baik dalam bentuk amonium maupun nitrat. Gunawan (1992) menyatakan bahwa media MS mengandung 40 mM N dalam bentuk NO_3 dan NH_4^+ , kalium ditingkatkan sampai 20 mM sedangkan fosfor 1,25 mM.

Menurut George dan Sherington (1984), terdapat dua jenis media dalam kultur jaringan berdasarkan bentuk fisiknya yaitu, media padat dan media cair yang mempunyai kelebihan dan kekurangan. Pemilihan jenis media disesuaikan dengan jenis eksplan dan tujuan yang diinginkan. Keuntungan menggunakan media padat antara lain adalah menghasilkan pertumbuhan tunas pucuk yang cepat, morfogenesis dari kalus yang baik, tunas serta akar tumbuh teratur dan tidak perlu pengocokan. Sedangkan kerugian penggunaan media padat ialah, perbanyakan lambat karena rendahnya ketersediaan sitokinin, kontak eksplan

dengan media sedikit sehingga kurang efisien dan ketersediaan hara lebih sedikit karena potensial air rendah.

Gunawan (1992) menyatakan bahan pematat yang sering digunakan dalam pembuatan media padat adalah agar, sebab bahan ini memiliki keuntungan antara lain membeku pada suhu 45°C dan mencair pada suhu 100°C sehingga dalam kisaran suhu kultur akan berada dalam keadaan beku yang stabil, tidak dicerna oleh enzim tanaman dan tidak bereaksi dengan persenyawaan-persenyawaan penyusun media. Faktor lain yang perlu diperhatikan adalah pH yang diatur sedemikian rupa sehingga tidak mengganggu fungsi membran sel dan pH sitoplasma. Sel-sel tanaman membutuhkan pH yang sedikit masam berkisar antara 5,5-5,8.

F. Zat Pengatur Tumbuh

Wattimena (1988) mengemukakan zat pengatur tumbuh didefinisikan sebagai senyawa organik bukan nutrisi yang aktif dalam jumlah yang kecil (10^{-6} hingga 10^{-5} μM) yang disintesis pada bagian tertentu dari tanaman pada umumnya diangkut ke bagian lain tanaman dimana zat dimana zat tersebut menimbulkan tanggapan secara biokimia, fisiologis dan morfologis. Zat Pengatur Tumbuh Tanaman (ZPT) yang dihasilkan oleh tanaman selanjutnya disebut sebagai fitohormon, sedangkan yang sintetik disebut zat pengatur tumbuh tanaman sintetik. Selama ini telah dikenal 5 golongan fitohormon pada tanaman

Gunawan (1988) mengemukakan bahwa dalam kultur jaringan, dua golongan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang sangat penting adalah sitokinin dan auksin. ZPT ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, jaringan, dan organ. Interaksi dan perimbangan antara ZPT yang diberikan dalam media dan yang diproduksi oleh sel secara endogen, menentukan arah perkembangan suatu kultur. Hal ini diperkuat pernyataan Hartman *et al* (1990) bahwa tanaman yang berbeda dapat merespon zat pengatur tumbuh ZPT (auksin dan sitokinin) dalam berbagai konsentrasi secara berbeda. Hal ini disebabkan oleh perbedaan kandungan konsentrasi hormon endogen tumbuhan itu sendiri.

Auksin dan sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang biasanya dibutuhkan dalam media kultur jaringan yang diberikan dalam konsentrasi sesuai dengan pertumbuhan dan perkembangan yang diinginkan. Sitokinin juga dapat

mendorong pembentukan tunas tetapi menghambat pembentukan akar jika digunakan dalam konsentrasi tinggi (1-10 mg/l). Sitokinin dapat mencegah penuaan dan mendorong pembentukan tunas samping dengan mengurangi dominasi apikal (Pierik, 1987).

Untuk pembentukan tunas, zat pengatur tumbuh (ZPT) yang sering digunakan adalah sitokinin seperti benzil adenin (BA) atau benzil amino purine (BAP), kinetin, isopentenil adenin (2-iP), zeatin dan thidiazuron (TDZ). Kebutuhan dan jenis ZPT yang digunakan untuk masing-masing genotipe tidak sama. Pada tanaman berkayu umumnya digunakan BA dengan konsentrasi yang lebih tinggi yakni 1-10 mg/l, sedangkan pada tanaman herba diperlukan konsentrasi yang lebih rendah. Untuk pembentukan tunas kadang digunakan secara bersama-sama kedua jenis zat pengatur tumbuh sitokinin dan auksin dengan perbandingan tertentu (Lestari, 2008).

Zat pengatur tumbuh sitokinin merupakan turunan purin yang memiliki substitusi N⁶ dengan rantai samping isopentenil. Sitokinin alamiah dalam tanaman adalah zeatin, sedangkan sitokinin sintetik diantaranya adalah 6-Benzil amino purin (BAP), N⁶-2-isopentenil adenin dan kinetin. Pemberian sitokinin secara eksogen berpengaruh terhadap pembelahan sel, perbesaran sel, perkembangan kloroplas, diferensiasi sel, dan morfogenesis (Davies, 1995).

Peranan sitokinin juga dapat meningkatkan aktivitas sintesis RNA, sintesis protein dan aktivitas enzim, serta dapat merangsang pembentukan tunas aksilar (George dan Sherrington, 1984; Pierik, 1987). Lestari (2008) menyatakan pertumbuhan dan organogenesis secara *in vitro* sangat tergantung pada interaksi antara zat pengatur tumbuh endogen dengan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan kedalam media.

BAB III BAHAN DAN METODA

A. Waktu dan Tempat

Percobaan ini telah dilaksanakan selama 4 bulan, dari bulan Desember 2013 sampai Maret 2014 di Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang (Jadwal kegiatan dapat dilihat pada Lampiran 1).

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam percobaan ini adalah timbangan analitik, autoklaf, hotplate, magnetic stirer, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFB), refrigerator, oven, mesin pengocok/*shaker*, kertas lakmus, gelas piala, *erlenmeyer*, labu ukur, gelas ukur, corong, pipet mikro, pengaduk kaca, rak kultur, bunsen, kertas label, aluminium foil, plastik wrap, autoklaf, kompor gas, scalpel, gunting, pinset, pipet gondok, plastik kaca, karet gelang, petridish, kamera, tisu, hand sprayer, meteran, jangka sorong, spatula, dan alat tulis.

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah biji tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* Moens) yang berasal dari Pusat Penelitian Teh dan Kina, Gambung, Jawa Barat. Media Murashige & Skoog (MS), Media perlakuan (MS+ZPT), BAP, kinetin, fungisida, bakterisida, alkohol 70 %, NaOCl 20 %, spiritus, sukrosa, agar phytigel, akuades, detergen lembut.

C. Rancangan Percobaan

Percobaan ini disusun dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan dalam percobaan ini adalah kombinasi antara BAP 3 mg/l dengan 5 taraf konsentrasi kinetin, yaitu:

- (A) BAP 3 mg/l + kinetin 0 mg/l
- (B) BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l
- (C) BAP 3 mg/l + kinetin 1 mg/l
- (D) BAP 3 mg/l + kinetin 1,5 mg/l
- (E) BAP 3 mg/l + kinetin 2 mg/l

Dari 5 taraf perlakuan tersebut diulang sebanyak 4 kali, sehingga terdapat 20 satuan percobaan. Pada masing-masing satuan percobaan terdiri dari 3 botol kultur, sehingga terdapat 60 botol kultur. Data hasil pengamatan di analisis secara statistik dengan uji F dan jika F hitung lebih besar dari F table 5 % maka dilanjutkan dengan Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) pada taraf nyata 5%.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Penyediaan Bahan Tanam

Biji kina disterilkan dalam larutan NaOCl 20% selama 15 menit dan bilas menggunakan akuades. Kemudian diikuti dengan sterilisasi dalam larutan fungisida (1 g/l) selama satu jam pada mesin pengocok dengan kecepatan 80 rpm dan bilas menggunakan akuades. Selanjutnya sterilisasi dalam larutan bakterisida (1 g/l) selama satu jam sambil dikocok pada mesin pengocok dengan kecepatan 80 rpm dan bilas menggunakan akuades. Biji dikecambahkan kedalam media MS tanpa ZPT selama 12 minggu sampai tingginya mencapai ± 5 cm, biji ini ditanam didalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC). Dari hasil kecambah tersebut diambil bagian tunas aksilar dan di kulturkan pada medium MS dengan penambahan BAP 6 mg/l sebagai tanaman induk. Sumber eksplan yang akan digunakan untuk multiplikasi tunas, merupakan nodus ketiga dengan panjang ± 10 mm.

2. Sterilisasi Alat

Alat-alat seperti petridish, skalpel, botol, pinset dan peralatan lainnya dicuci dengan deterjen dan dibilas hingga bersih, selanjutnya botol direndam dalam larutan NaOCl selama 24 jam kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 15 Psi dengan suhu 121°C selama 30 menit hingga tekanan kembali 0 Psi. Alat-alat seperti petridis dibungkus dengan kertas sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf. Alat-alat yang digunakan setelah sterilisasi di simpan dalam oven. *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) disterilkan dengan menggunakan sinar UV minimal selama 1 jam sebelum penanaman dan disemprot dengan alkohol 70 % setiap kali akan digunakan dan setelah selesai digunakan.

3. Pembuatan Media

Media yang digunakan ialah media MS dengan zat kimia penyusun pada Lampiran 2 yang dibagi menjadi beberapa larutan stok (A, B, C, D, E dan F) berdasarkan jenis garamnya dan pada Lampiran 3 dipaparkan cara pembuatan larutan stok media MS. Dalam larutan stok ini takaran dipekatkan sehingga saat pembuatan media tanam hanya dengan memipet sejumlah volume tertentu sesuai takaran yang diperlukan. Larutan vitamin ditempatkan pada botol-botol yang terpisah.

Percobaan ini menggunakan BAP dengan konsentrasi 3 mg/l yang dikombinasikan dengan 5 taraf konsentrasi kinetin mulai dari 0, 0,5, 1, 1,5 dan 2 mg/l (Cara pembuatan larutan stok ZPT dan pipetannya dapat dilihat pada Lampiran 4). Total media yang dibuat sebanyak 6 l. Langkah pertama dalam membuat media adalah memipet seluruh larutan stok media MS, menimbang myo-inositol 100 mg/l, dan sukrosa 30 g/l, lalu myo-inositol dan sukrosa dimasukkan ke dalam gelas piala ukuran 1 liter yang telah berisi larutan media MS, kemudian dicukupkan dengan akuades hingga volume 500 ml, diaduk dan homogenkan larutan tersebut. Bagi larutan media MS tersebut kedalam lima perlakuan, dimana masing-masing perlakuan berisi 100 ml media MS dan dimasukkan kedalam gelas piala ukuran 500 ml. Selanjutnya tambahkan BAP dan kinetin dengan konsentrasi yang telah ditentukan ke dalam masing-masing gelas piala, ukur pH media sampai 5,8 dengan menggunakan kertas lakmus, tambahkan beberapa tetes NaOH 0,1 N jika pH kurang dari 5,8 dan dengan HCl 0,1 N jika pH lebih dari 5,8 pada masing-masing media perlakuan tersebut volume dicukupkan dengan akuades hingga 200 ml dan tambahkan agar 1,6 g ke dalam setiap media perlakuan.

Kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam botol kultur sebanyak 25 ml per botol dan ditutup dengan aluminium foil. Setiap botol diberi label sesuai dengan perlakuan yang digunakan. Lalu media disterilkan dalam autoklaf pada tekanan 15 Psi dan suhu 121° C selama 30 menit, kemudian botol disusun pada rak kultur yang berada didalam ruang inkubasi selama satu minggu untuk mengetahui apakah media tersebut terkontaminasi atau tidak. Media yang terkontaminasi harus segera dikeluarkan dari ruang inkubasi.

4. Penanaman

Kegiatan penanaman eksplan dilakukan dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) yang telah disterilkan. Botol kultur yang telah berisi media, alat tanam, lampu spritus dan peralatan lainnya yang telah disterilkan sebelum dimasukkan ke dalam LAFC terlebih dahulu disemprot dengan alkohol 70 %. Kegiatan penanaman diawali dengan merendam semua alat-alat yang digunakan seperti pinset, gunting, dan skalpel kedalam larutan alkohol 70 % kemudian dibakar dengan menggunakan api bunsen.

Eksplan yang akan digunakan untuk multiplikasi tunas tidak dilakukan upaya sterilisasi lagi, karena eksplan ini berasal dari biji yang dikecambahkan secara *in vitro* dalam keadaan yang aseptik. Sumber eksplan merupakan nodus ketiga yang berukuran ± 10 mm. Kemudian eksplan ini ditanam dalam media perlakuan, dimana masing-masing botol berisi satu eksplan. Media kultur yang telah ditanam ditutup menggunakan lakban bening dan plastik wrap, dan diberi label. Selanjutnya botol-botol kultur yang telah selesai ditanam, disimpan ke ruang inkubasi dan disusun berdasarkan denah penempatan perlakuan pada rak kultur.

5. Pemeliharaan

Pemeliharaan meliputi menjaga kebersihan, pemisahan eksplan atau media yang telah terkontaminasi oleh mikroorganisme dari ruang inkubasi. Penyemprotan lokasi percobaan dan botol-botol eksplan dilakukan setiap hari dengan menggunakan alkohol 70 %.

6. Pengamatan

a. Persentase Eksplan Hidup (%)

Pengamatan terhadap eksplan yang hidup dihitung pada saat pengamatan terakhir 12 MST (Minggu Setelah Tanam).

$$\% \text{ Eksplan hidup} = \frac{\sum \text{eksplan yang hidup}}{\sum \text{eksplan yang dikulturkan}} \times 100 \%$$

b. Saat Muncul Tunas (Hari Setelah Tanam)

Pengamatan saat munculnya tunas dimulai jika telah terbentuk tunas baru pada eksplan. Saat muncul tunas mulai diamati sehari setelah tanam sampai

seluruh eksplan menghasilkan tunas atau sampai minggu terakhir pengamatan (12 Minggu Setelah Tanam).

c. Persentase Eksplan Membentuk Tunas (%)

Pengamatan dilakukan pada akhir percobaan yaitu pada 12 MST pada masing-masing perlakuan. Persentase eksplan yang membentuk tunas dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Eksplan membentuk tunas} = \frac{\Sigma \text{eksplan yang membentuk tunas}}{\Sigma \text{eksplan yang dikulturkan}} \times 100 \%$$

d. Jumlah Tunas per Eksplan (buah)

Jumlah tunas yang dihitung adalah jumlah tunas yang muncul pada setiap perlakuan. Tunas yang dihitung adalah tunas yang daunnya telah membuka sempurna. Penghitungan dilakukan pada 1 MST sampai akhir percobaan yaitu 12 MST.

e. Tinggi Tunas (cm)

Pengamatan terhadap tinggi tunas dilakukan dengan mengukur tunas tertinggi pada masing-masing botol menggunakan penggaris yang lentur. Tinggi tunas diukur mulai dari tempat keluarnya tunas sampai titik tumbuh, dan ketika mengukur tinggi tunas penggaris diletakkan disisi botol tepat disamping tunas yang akan diukur. Penghitungan dilakukan pada 1 MST sampai akhir percobaan yaitu 12 MST.

f. Jumlah Daun (helai)

Pengamatan terhadap jumlah daun dilakukan pada 1 MST sampai akhir percobaan yaitu 12 MST. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah daun pada masing-masing perlakuan.

g. Bobot Segar Shootlet (g)

Pengamatan terhadap bobot segar tanaman dilakukan pada 12 MST, dan ditimbang menggunakan timbangan analitik.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Persentase Eksplan Hidup (%)

Analisis ragam terhadap persentase eksplan hidup umur 12 MST (Minggu Setelah Tanam) dapat dilihat pada Lampiran 6 a. Pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin tidak memberikan pengaruh terhadap persentase eksplan hidup pada kina *ledger* secara *in vitro*. Hasil pengamatan persentase eksplan hidup umur 12 MST dapat dilihat pada Tabel 3

Tabel 3. Persentase eksplan hidup umur 12 MST pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin

Perlakuan	Rata-rata
	Persentase eksplan yang hidup (%)
BAP 3 mg/l + kinetin 0 mg/l	75,00
BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l	100,00
BAP 3 mg/l + kinetin 1 mg/l	100,00
BAP 3 mg/l + kinetin 1,5 mg/l	75,00
BAP 3 mg/l + kinetin 2 mg/l	83,34
KK = 25,32 %	

Angka-angka pada lajur tidak berbeda nyata menurut uji F pada taraf nyata 5 %

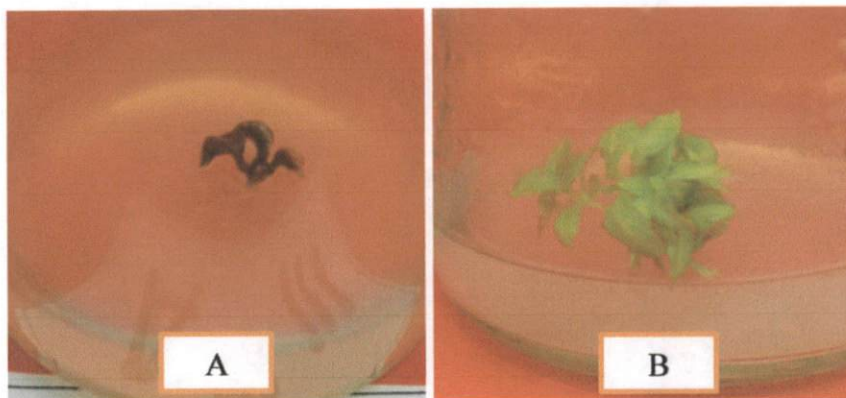
Berdasarkan Tabel 3 terlihat bahwa pemberian BAP 3 mg/l dengan penambahan kinetin 0,5 mg/l dan 1 mg/l menunjukkan pertumbuhan eksplan hidup 100 %. Penambahan kinetin sebanyak 1,5 mg/l mengalami penurunan tingkat persentase hidup yaitu 75 % dan sama halnya tanpa penambahan kinetin (0 mg/l). Sedangkan penambahan kinetin 2 mg/l menunjukkan kembali peningkatan persentase hidup eksplan yaitu 83,34 %. Hal ini dipengaruhi oleh proses pencoklatan (*browning*) dalam kultur jaringan yang merupakan penyebab meningkatnya produksi senyawa fenolat yang diikuti oksidasi oleh aktivitas enzim oksidase (PPO). *Browning* terjadi akibat pelukaan karena pemotongan jaringan pada eksplan, luka tersebut akan memacu stress dan peningkatan aktivitas fenilalanin ammonia liase (PAL) yang diikuti oleh produksi fenilpropanoid.

Eksplan yang hidup dicirikan dengan keadaan warna eksplan yang masih berwarna hijau dan eksplan yang mati ditandai dengan mencoklatnya bagian eksplan secara perlahan-lahan pada waktu 3-4 minggu setelah pengkulturan eksplan. Hal ini sesuai dengan pendapat Tang dan Newton (2004), bahwa pada kalus *Virginia pine* terjadinya peningkatan lipid peroksida dan polifenol oksidase

serta penurunan aktivitas enzim anti oksidan secara cepat sesaat setelah pengkulturan dimulai, khususnya pada 3-4 minggu periode kultur.

Kemampuan eksplan hidup dan menghasilkan tunas pada kultur *in vitro* sangat tergantung dari eksplan itu sendiri, jenis dan komposisi media serta kandungan zat pengatur tumbuh yang diberikan. Jenis dan komposisi media sangat mempengaruhi besarnya daya tahan eksplan, sedangkan zat pengatur tumbuh eksogen dan endogen berpengaruh terhadap besarnya penyerapan zat makanan yang tersedia dalam kultur *in vitro*. Wattimena *et al* (1992) menyatakan bahwa pertumbuhan dan morfogenesis tanaman secara *in vitro* dikendalikan oleh keseimbangan dan interaksi dari zat pengatur tumbuh yang terdekat dalam eksplan, baik bersifat eksogen maupun endogen.

Gambar dibawah ini menunjukkan perbedaan antara eksplan yang mati dan mengalami *browning* dengan eksplan yang hidup pada tanaman kina *ledger* secara *in vitro*.



Gambar 1. Eksplan yang mengalami mati dan *browning* (A), eksplan yang hidup hingga 12 MST (B)

B. Saat Muncul Tunas (HST)

Analisis ragam terhadap saat muncul tunas dapat dilihat pada Lampiran 6 b. Pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap saat muncul tunas pada eksplan kina secara *in vitro*. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4 terlihat bahwa pemberian BAP 3 mg/l dengan penambahan kinetin 0,5 mg/l dan 1 mg/l optimum terhadap saat muncul tunas kina *ledger* secara *in vitro* yaitu 5,92 dan 8,08 HST sedangkan penambahan kinetin dengan konsentrasi yang lebih tinggi 1,5 mg/l dan 2 mg/l menyebabkan penekanan terhadap saat

muncul tunas yaitu 12,33 dan 12,84 HST dan perlakuan tanpa penambahan kinetin kurang menstimulasi pertumbuhan tunas kina sehingga tunas muncul pada 10,83 HST. Secara umum eksplan mampu bertunas rata-rata pada hari ke 5 hingga 12 HST. Berdasarkan percobaan Santoso *et al* (2004), terhadap nodus asal kecambah *in vitro ledger* dan *succi*, inisiasi tunas terjadi pada hari ke 7 sedangkan jumlah eksplan bertunas telah mencapai lebih dari 50 % dari populasi eksplan yang ditanam pada umur 14 HSK (Hari Setelah Kultur).

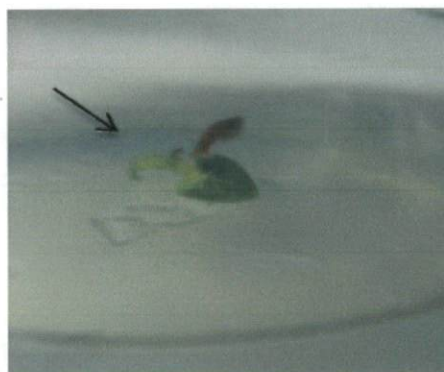
Tabel 4. Saat muncul tunas pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin

Perlakuan	Rata-rata	
	Saat Muncul Tunas (Hari Setelah Tanam)	
BAP 3 mg/l + kinetin 0 mg/l	10,83	b
BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l	5,92	d
BAP 3 mg/l + kinetin 1 mg/l	8,08	c
BAP 3 mg/l + kinetin 1,5 mg/l	12,33	a b
BAP 3 mg/l + kinetin 2 mg/l	12,84	a

KK = 12,53 %

Angka-angka pada lajur diikuti huruf kecil yang sama tidak berbeda nyata menurut DNMR 5 %

Tunas merupakan ranting muda yang baru tumbuh atau calon tanaman baru yang tumbuh dari bagian tanaman (Rahardja dan Wiryanta, 2003). Saat muncul tunas ditandai dengan adanya tonjolan berwarna kehijauan pada helaian daun. Jadi tunas yang pertama kali muncul pada eksplan merupakan pemanjangan mata tunas yang ada pada ketiak daun. Berikut dapat dilihat tunas yang muncul dari eksplan kina *ledger* pada Gambar 2.



Gambar 2. Tunas muncul pada eksplan kina *ledger*

Gunawan (1987) *cit* Lestari (2012) menyatakan dalam proses pembentukan organ seperti tunas atau akar ada interaksi antara zat pengatur

tumbuh eksogen yang ditambahkan ke dalam media dengan zat pengatur tumbuh endogen yang diproduksi oleh jaringan tanaman. Jika dilihat dari pemberian BAP 3 mg/l dengan penambahan konsentrasi kinetin yang rendah akan mempercepat waktu munculnya tunas, hal ini juga dipengaruhi dengan adanya sitokinin endogen pada eksplan dan kandungannya sudah cukup untuk memacu pembentukan tunas, sehingga tidak memerlukan zat pengatur tumbuh eksogen dengan konsentrasi yang tinggi. Dengan penambahan konsentrasi kinetin yang tinggi, akan menghambat pembentukan tunas pada eksplan. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), penambahan kadar yang tinggi pada auksin atau sitokinin lebih bersifat menghambat daripada merangsang pertumbuhan.

George dan Sherington (1984), menyatakan BAP merupakan salah satu zat pengatur tumbuh yang banyak digunakan untuk memacu pembentukan tunas dengan daya aktivitas yang kuat, serta mendorong pembelahan sel. Sitokinin alami yang terkandung didalam tubuh eksplan dapat merangsang eksplan untuk membentuk tunas. Menurut Gaba (2005) *cit* Lestari (2012), penambahan jenis zat pengatur tumbuh yang berbeda dari golongan yang sama seperti kinetin, zeatin dan 2 iP ke dalam media yang sudah mengandung Benzyl Adenin (BA) kadang dibutuhkan untuk memacu morfogenesis agar lebih optimal.

C. Persentase Eksplan Membentuk Tunas (%)

Analisis ragam terhadap eksplan yang membentuk tunas pada umur 12 MST pada pemberian kombinasi konsentrasi BAP 3 mg/l dengan kinetin memperlihatkan pengaruh tidak berbeda nyata dan dapat dilihat pada Lampiran 6 c. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Persentase eksplan membentuk tunas umur 12 MST pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin

Perlakuan	Rata-rata
	Persentase eksplan membentuk tunas (%)
BAP 3 mg/l + kinetin 0 mg/l	75,00
BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l	100,00
BAP 3 mg/l + kinetin 1 mg/l	100,00
BAP 3 mg/l + kinetin 1,5 mg/l	75,00
BAP 3 mg/l + kinetin 2 mg/l	83,34
KK = 25,32 %	

Angka-angka pada lajur tidak berbeda nyata menurut uji F pada taraf nyata 5 %

Berdasarkan Tabel 5 terlihat bahwa pemberian BAP 3 mg/l dengan penambahan beberapa konsentrasi kinetin (0; 0,5; 1; 1,5 dan 2 mg/l) tidak memberikan pengaruh terhadap persentase eksplan membentuk tunas. Kemampuan hidup dari eksplan dan menghasilkan tunas menunjukkan adanya respon yang sama, ini berarti bahan media dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam percobaan ini telah memenuhi persyaratan untuk eksplan dalam menghasilkan tunas. BAP dan kinetin berperan dalam pembelahan sel serta diferensiasi sel yang lebih ke arah pembentukan tunas. Sehingga dapat diketahui bahwa sitokinin sangat penting dalam menginduksi tunas tanaman kina secara *in vitro*.

Untuk menghasilkan tunas, zat pengatur tumbuh (ZPT) yang sering digunakan dari jenis sitokinin yaitu *Benzil Adenin* (BA) atau *Benzil Amino Purine* (BAP), kinetin, *isopentil adenine* (2-iP), zeatin dan *Thidiazuron* (TDZ). Kebutuhan dan jenis ZPT yang digunakan pada masing-masing *genotype* tanaman tidak sama. Pada tanaman berkayu umumnya digunakan BAP dengan konsentrasi 1-10 mg/l, sedangkan pada tanaman herba diperlukan konsentrasi yang lebih rendah. Untuk pembentukan tunas kadang digunakan secara bersamaan kedua jenis zat pengatur tumbuh sitokinin dan auksin dengan perbandingan tertentu (Lestari, 2008). George dan Sherington (1984) juga menyatakan bahwa interaksi sitokinin dan auksin dalam konsentrasi tertentu dapat mendorong terjadinya pertumbuhan dan differensiasi sel-sel pada eksplan.

D. Jumlah Tunas per Eksplan

Data hasil pengamatan yang diperoleh telah di transformasi menggunakan log y dan analisis ragam didapatkan bahwa pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin menunjukkan hasil berbeda nyata dalam meningkatkan jumlah tunas yang terbentuk dan dapat dilihat pada Lampiran 6 d. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6 memperlihatkan bahwa pemberian BAP 3 mg/l dengan penambahan kinetin 0,5 mg/l mampu menghasilkan jumlah tunas terbanyak 15,41 buah dan pada penambahan kinetin dengan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 2 mg/l menghasilkan jumlah tunas terendah 4,66 buah. Hal ini disebabkan

pemberian BAP 3 mg/l dan penambahan kinetin 0,5 mg/l merupakan konsentrasi yang optimum, karena kandungan sitokinin dalam eksplan sudah seimbang sehingga mampu menghasilkan jumlah tunas terbanyak, tetapi pada penambahan konsentrasi yang lebih tinggi akan bersifat menekan pertumbuhan tunas. Zaid (1985) *cit* Wenas (2003), ZPT eksogen terutama sitokinin dibutuhkan dalam media kultur jaringan terutama spesies tanaman berkayu, hanya saja perlu diatur keseimbangan dengan zat pengatur tumbuh terutama auksin. Sebab sitokinin mutlak diperlukan untuk pertumbuhan eksplan dalam kultur terutama pada proses differensiasi dan proliferasi.

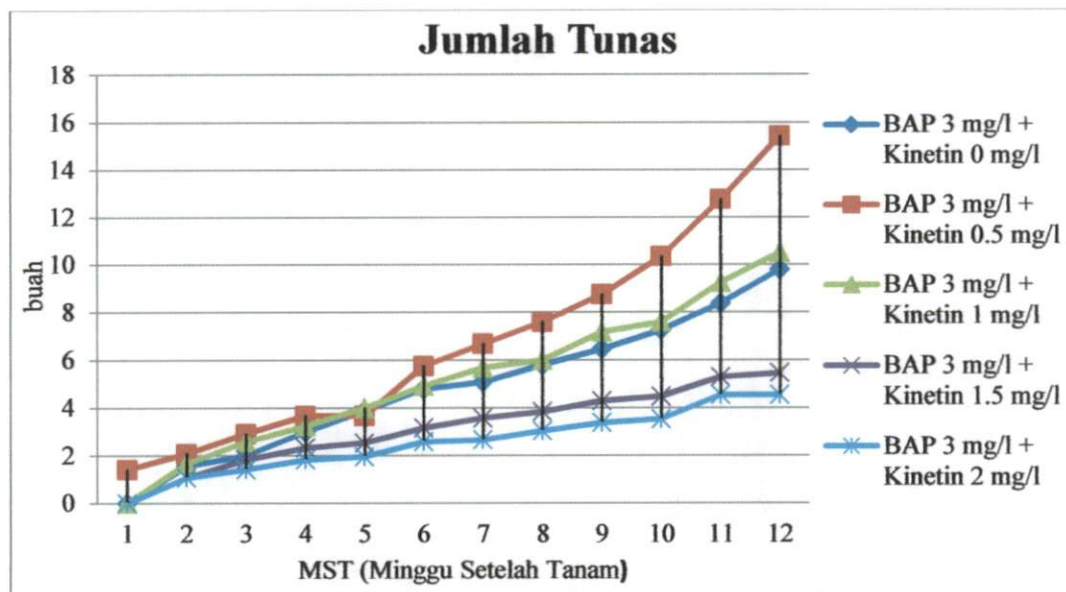
Tabel 6. Jumlah tunas per eksplan umur 12 MST pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin

Perlakuan	Jumlah tunas per eksplan (buah)	
	Data asal	Transformasi log y
BAP 3 mg/l + kinetin 0 mg/l	9,79	0,98 a
BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l	15,41	1,13 a
BAP 3 mg/l + kinetin 1 mg/l	10,50	1,02 a
BAP 3 mg/l + kinetin 1,5 mg/l	5,45	0,73 b
BAP 3 mg/l + kinetin 2 mg/l	4,66	0,65 b
KK = 14,61 %		

Angka-angka pada lajur diikuti huruf kecil yang sama tidak berbeda nyata menurut DNMRT 5 %

Jumlah tunas merupakan faktor penting dalam multiplikasi tanaman pada kultur jaringan. Dalam kultur jaringan jumlah tunas dapat diindikasikan sebagai keberhasilan dalam multiplikasi. Semakin banyak tunas yang terbentuk, maka dapat dilakukan multiplikasi kultur untuk mendapatkan tunas-tunas baru dalam jumlah yang semakin banyak juga. Skoog dan Miller (1957) *cit* Kieber dan Agustino (2002) mengatakan sitokinin terlibat dalam berbagai aspek pada pertumbuhan dan perkembangan tanaman terutama pembentukan tunas. Berdasarkan Tabel 6 dan merujuk pada Lampiran 9 terjadi penambahan jumlah tunas dari 4 MST, 8 MST dan 12 MST pada seluruh perlakuan. Peningkatan jumlah tunas terjadi dari 4 MST ke 8 MST dan mengalami penurunan dari 8 MST ke 12 MST. Hal ini menandakan bahwa pertumbuhan tunas melaju cepat pada 4 MST hingga 8 MST, sedangkan dari 8 MST ke 12 MST pertumbuhan tunas cenderung stabil.

Gambar 3 dibawah memperlihatkan bahwa jumlah tunas yang terbentuk hingga 12 minggu setelah tanam (MST) diperoleh dari perlakuan terbaik yaitu BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l, BAP 3 mg/l + kinetin 1 mg/l, BAP 3 mg/l + kinetin 0 mg/l, BAP 3 mg/l + kinetin 1,5 mg/l dan BAP 3 mg/l + kinetin 2 mg/l.



Gambar 3. Pertumbuhan jumlah tunas kina *ledger* pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin dari 1-12 MST

E. Tinggi Tunas (cm)

Hasil analisis ragam pertumbuhan tinggi tunas kina secara *in vitro* pada umur 12 minggu setelah tanam (MST) dapat dilihat pada Lampiran 6 e. Pada lampiran tersebut terlihat bahwa pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin memberikan pengaruh berbeda nyata. Hasil pengamatan tinggi tunas disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Tinggi tunas umur 12 MST pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin

Perlakuan	Rata-rata	
	Tinggi tunas (cm)	
BAP 3 mg/l + kinetin 0 mg/l	1,44	c
BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l	3,25	a
BAP 3 mg/l + kinetin 1 mg/l	2,42	b
BAP 3 mg/l + kinetin 1,5 mg/l	1,02	c
BAP 3 mg/l + kinetin 2 mg/l	0,93	c

KK = 27,07 %

Angka-angka pada lajur diikuti huruf kecil yang sama tidak berbeda nyata menurut DNMR 5 %

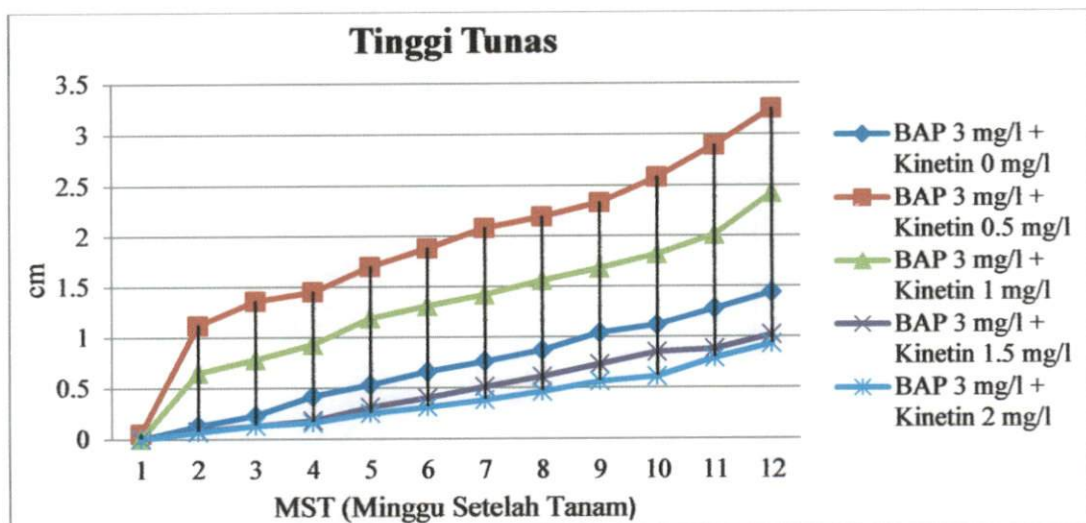
Berdasarkan Tabel 7 terlihat bahwa masing-masing perlakuan berpengaruh nyata dalam meningkatkan pertumbuhan tinggi tunas, pada perlakuan BAP 3 mg/l dengan penambahan kinetin 0,5 mg/l menghasilkan tinggi tunas tertinggi 3,25 cm dan penambahan kinetin 2 mg/l menghasilkan tinggi tunas terendah 0,93 cm. Ini berarti bahwa perlakuan yang diberikan pada beberapa konsentrasi mampu memberikan pengaruh yang nyata terhadap tinggi tunas yang dihasilkan, sehingga menunjukkan penambahan konsentrasi kinetin yang lebih tinggi dapat menghambat pertumbuhan tinggi tunas dan tanpa penambahan kinetin pada media perlakuan kurang memberikan stimulasi terhadap pertumbuhan tinggi tunas tanaman kina secara *in vitro*. Pemberian BAP 3 mg/l dengan penambahan kinetin 0,5 mg/l memperlihatkan bahwa perlakuan yang diberikan dalam konsentrasi yang rendah mampu meningkatkan tinggi tunas yang optimum dari seluruh perlakuan yang diberikan, disamping itu nutrisi yang terkandung didalam media MS mampu mendorong pertumbuhan tunas kina. Menurut Hoesen (1998), keberhasilan kultur *in vitro* ditentukan oleh zat pengatur tumbuh dan media dasar yang digunakan.

Hal tersebut juga dapat dilihat dalam perkembangan peningkatan persentase tinggi tunas pada Lampiran 10, terjadi peningkatan tinggi tunas yang terbentuk pada seluruh perlakuan dari 4 MST, 8 MST dan 12 MST. Namun pada persentase peningkatan tinggi tunas melaju pesat dari 4 MST ke 8 MST, sedangkan dari 8 MST ke 12 MST terjadi penurunan persentase karena peningkatan tinggi tunas pada minggu tersebut cenderung stabil. Pemberian BAP 3 mg/l dengan penambahan kinetin 0,5 mg/l sudah cukup efektif untuk memacu pertumbuhan tinggi tunas, terutama pada konsentrasi rendah. Namun penambahan IBA sebagai golongan auksin dalam media kultur dapat meningkatkan pertumbuhan tinggi tunas (Hunter, 1988 *cit* Krikorian *et al*, 1982). Menurut Wattimena *et al* (1992), zat pengatur tumbuh umumnya digunakan secara kombinasi, dan morfogenesis dari eksplan selalu tergantung pada pemberian auksin dan sitokinin yang seimbang. Gunawan (1988) menyatakan tingginya respon jaringan untuk tumbuh disebabkan penambahan auksin dan sitokinin yang mampu merubah tingkat zat pengatur tumbuh dan sel.

Menurut Heddy (1996), auksin dapat merangsang pemanjangan sel sehingga berakibat pada pemanjangan koleoptil dan batang. Distribusi auksin

yang tidak sama disertai dengan pembengkakan organ (*geotropisme* dan *fototropisme*). Pemanjangan batang tidak membutuhkan sitokinin dalam konsentrasi yang tinggi atau memerlukan sitokinin eksogen dalam konsentrasi yang rendah, karena kandungan sitokinin endogen sudah mencukupi. Menurut Lakitan (1996), penambahan sitokinin eksogen dengan konsentrasi tinggi tidak lagi berpengaruh bahkan dapat menghambat pertumbuhan karena konsentrasi sitokinin menjadi eksekif (*supra optimum*).

Gambar 4 dibawah memperlihatkan bahwa jumlah tunas yang terbentuk hingga 12 minggu setelah tanam (MST) terbaik diperoleh dari perlakuan BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l, dan dilanjutkan pada perlakuan BAP 3 mg/l + kinetin 1 mg/l, BAP 3 mg/l + kinetin 0 mg/l, BAP 3 mg/l + kinetin 1,5 mg/l dan BAP 3 mg/l + kinetin 2 mg/l.



Gambar 4. Pertumbuhan tinggi tunas kina *ledger* pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin dari 1-12 MST

F. Jumlah Daun (helai)

Proses perkembangan bakal tunas diawali dengan pembelahan sel secara periklinal di sisi lateral (periferal), dibawah daerah distal meristem pucuk. Pembelahan sel secara periklinal yang diikuti dengan pertumbuhan sel anak yang menyebabkan tonjolan yang membentuk primordia daun, sedangkan pembelahan sel secara antiklinal dapat meningkatkan luas permukaan primordia daun. Primordia daun ditopang oleh sel prokambium, selanjutnya prokambium tersebut akan menjadi tulang daun (Qosim *et al* 2005).

Daun merupakan organ vegetatif, pertumbuhannya dipengaruhi oleh kandungan nitrogen dalam media, selain itu daun merupakan organ yang penting dalam pertumbuhan tanaman, karena daun sebagai tempat terjadinya fotosintesis yaitu proses pembentukan karbohidrat dari CO_2 dan H_2O dengan bantuan cahaya matahari. Semakin banyak jumlah daun, mengindikasikan pertumbuhan eksplan yang semakin baik.

Data hasil pengamatan telah ditransformasi menggunakan log y, berdasarkan analisis ragam didapatkan bahwa pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin memperlihatkan hasil yang berbeda nyata dalam meningkatkan jumlah daun yang terbentuk dan dapat dilihat pada Lampiran 6 f. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Jumlah daun yang terbentuk pada umur 12 MST pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin

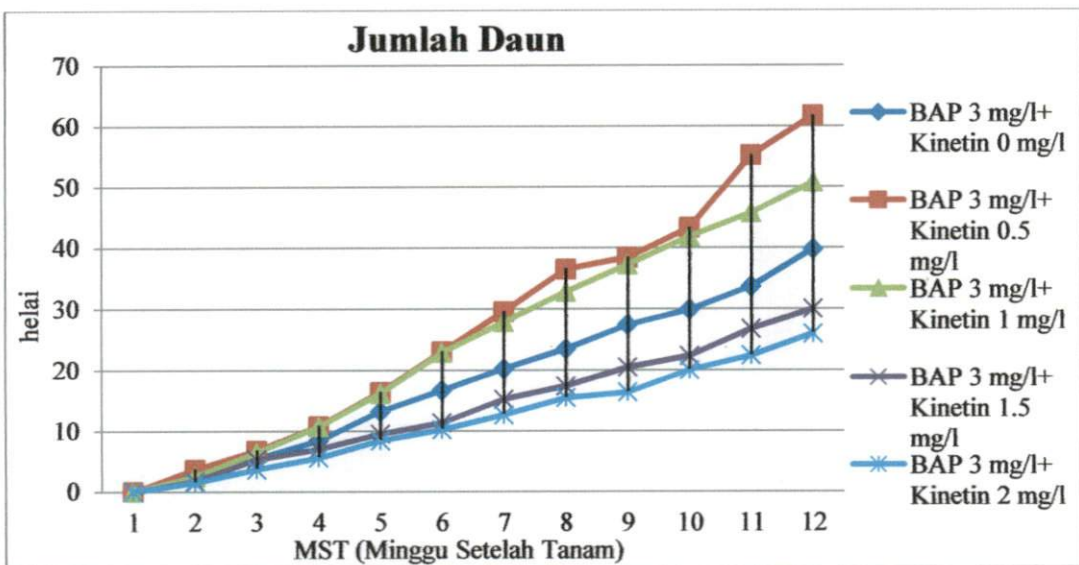
Perlakuan	Jumlah Daun (helai)	
	Data asal	Transformasi log y
BAP 3 mg/l + Kinetin 0 mg/l	39,75	1,59 b
BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l	61,75	1,73 a
BAP 3 mg/l + kinetin 1 mg/l	50,75	1,71 a
BAP 3 mg/l + kinetin 1,5 mg/l	29,21	1,43 c
BAP 3 mg/l + kinetin 2 mg/l	26,00	1,42 c
KK = 9,5 %		

Angka-angka pada lajur diikuti huruf kecil yang sama tidak berbeda nyata menurut DNMR 5 %

Tabel 8 menunjukkan bahwa pemberian BAP 3 mg/l dengan penambahan kinetin 0,5 mg/l dan 1 mg/l menghasilkan jumlah daun tertinggi 61,75 dan 50,75 helai dan pada penambahan kinetin dengan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 1,5 mg/l dan 2 mg/l menghasilkan jumlah daun terendah 29,21 dan 26 helai sehingga terjadi penekanan terbentuknya jumlah daun. Sedangkan tanpa penambahan kinetin ke dalam media perlakuan BAP 3 mg/l pertumbuhan tidak optimum karena kurang terstimulasi sehingga menghasilkan jumlah daun 39,75. Hal ini disebabkan pembentukan daun pada perbanyakan kultur jaringan juga dipengaruhi oleh konsentrasi hormon sitokinin yang ditambahkan ke dalam media. Seiring dengan pernyataan Yelnitis (1996) *cit* Purwanto (2008), bahwa penambahan golongan BAP pada rasio sitokinin yang lebih tinggi dibandingkan auksin pada media dapat mendorong meningkatkan jumlah daun.

Pemberian perlakuan BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin mampu memberikan pengaruh yang nyata terhadap jumlah daun yang dihasilkan. Hal tersebut dapat dilihat dalam perkembangan jumlah daun yang terdapat pada Lampiran 11, bahwa pemberian kombinasi BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin mampu meningkatkan jumlah daun yang terbentuk pada 4 MST, 8 MST dan 12 MST pada seluruh perlakuan. Peningkatan persentase terbentuknya jumlah daun melaju pesat dari 4 MST ke 8 MST pada seluruh perlakuan yang diberikan dan mengalami penurunan dari 8 MST ke 12 MST karena pertumbuhan pada minggu tersebut cenderung stabil.

Gambar 5 dibawah memperlihatkan bahwa jumlah daun yang terbentuk hingga 12 minggu setelah tanam (MST) terbaik diperoleh dari pemberian BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l, BAP 3 mg/l + kinetin 1 mg/l, BAP 3 mg/l + kinetin 0 mg/l, BAP 3 mg/l + kinetin 1,5 mg/l dan BAP 3 mg/l + kinetin 2 mg/l.



Gambar 5. Pertumbuhan jumlah daun kina *ledger* pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin dari 1-12 MST

G. Bobot Segar Shootlet (g)

Data hasil pengamatan telah dilakukan transformasi menggunakan $\sqrt{y} + 0,5$. Berdasarkan analisis ragam didapatkan bahwa pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin memberikan pengaruh terhadap bobot segar shootlet yang dihasilkan dan dapat dilihat pada Lampiran 6 g. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 9 berikut.

Tabel 9. Bobot segar shootlet umur 12 MST pada pemberian BAP 3 mg/l dengan beberapa konsentrasi kinetin

Perlakuan	Bobot Segar Shootlet (g)	
	Data asal	Transformasi $\sqrt{y} + 0,5$
BAP 3 mg/l + kinetin 0 mg/l	0,18	0,82 b
BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l	0,70	1,08 a
BAP 3 mg/l + kinetin 1 mg/l	0,37	0,93 b
BAP 3 mg/l + kinetin 1,5 mg/l	0,14	0,80 b
BAP 3 mg/l + kinetin 2 mg/l	0,13	0,79 b

KK = 11,45 %

Angka-angka pada lajur diikuti huruf kecil yang sama tidak berbeda nyata menurut DNMRT 5 %

Bobot segar shootlet tertinggi yang ditunjukkan pada Tabel 9, bahwa pemberian konsentrasi BAP 3 mg/l dengan penambahan kinetin 0,5 mg/l menghasilkan bobot segar shootlet tertinggi 0,70 g dan berbeda nyata terhadap seluruh perlakuan yang diberikan. Dengan penambahan kinetin 2 mg/l menghasilkan bobot segar shootlet terendah 0,13 g dan tidak berbeda nyata terhadap pemberian BAP 3 mg/l dengan penambahan kinetin 0, 0,5, 1, 1,5 dan 2 mg/l. Hal ini mungkin terjadi karena kandungan sitokinin belum mampu untuk meningkatkan bobot shootlet yang terbentuk, sehingga masih membutuhkan zat pengatur tumbuh eksogen dari golongan auksin untuk meningkatkan bobot basah shootlet. Bobot basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya tunas. Walaupun demikian pemberian BAP 3 mg/l dengan penambahan kinetin 0,5 mg/l berpengaruh nyata terhadap bobot segar shootlet, sehingga dengan penambahan konsentrasi yang rendah bisa meningkatkan bobot segar shootlet.

Bobot segar shootlet yang besar disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi. Kandungan air yang tinggi merupakan akibat dari sedikitnya proses transpirasi yang terjadi pada saat tunas tanaman kina berada dalam kondisi *in vitro*. Menurut Dwidjoseputro (1990) bahwa 80% atau lebih dari bobot segar tanaman hidup terdiri dari air. Disamping itu menurut Pierik (1987) nutrisi penting untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman, tanpa air dan nutrisi mineral tanaman tidak bisa hidup secara *in vitro* maupun *in vivo*. Hal ini juga dinyatakan Prawiranata *et al* (1981) bobot segar mencerminkan komposisi

karbohidrat dan unsur hara dari jaringan tanaman dengan mengikutsertakan kandungan airnya.

Arah perkembangan kultur ditentukan oleh interaksi dan keseimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media (eksogen) dan yang diproduksi oleh sel tanaman secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur. Sebab didalam eksplan itu sendiri sudah ada zat pengatur tumbuh endogen, tapi dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro* zat pengatur tumbuh eksogen masih perlu ditambahkan (Santoso dan Nursandi, 2004).

Penambahan kinetin ke dalam media berperan untuk mendorong proses morfogenesis shootlet, dan dapat mempengaruhi kestabilan jumlah sel tanaman pada tanaman kina secara *in vitro*. Menurut Gunawan (1988) peran fisiologis dari sitokinin adalah mendorong pembelahan sel, pertumbuhan morfogenesis tanaman, pembentukan tunas serta menghambat *senescence* dan absisi.

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil percobaan didapatkan perlakuan terbaik untuk multiplikasi tunas tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* Moens) yaitu pada pemberian BAP 3 mg/l dengan kinetin 0,5 mg/l. Perlakuan ini memberikan respon saat muncul tunas tercepat 5,92 HST, tinggi tunas tertinggi 3,25 cm, jumlah tunas terbanyak 15,41 buah, membentuk jumlah daun terbanyak 61,75 helai, dan bobot segar shootlet tertinggi 0,70 g pada tanaman kina *ledger* umur 12 MST (Minggu Setelah Tanam). Untuk persentase eksplan yang hidup dan persentase eksplan yang membentuk tunas belum berpengaruh pada seluruh perlakuan yang diberikan.

B. Saran

Berdasarkan kondisi percobaan dan kesimpulan tersebut, untuk mendapatkan multiplikasi tunas kina *ledger* dapat mengkulturkannya pada media dengan perlakuan terbaik, yaitu pada pemberian BAP 3 mg/l dengan kinetin 0,5 mg/l. Disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut untuk beberapa konsentrasi BAP dan kinetin dengan penambahan auksin, sehingga meningkatkan tinggi tunas dan pembentukan akar, agar terbentuknya planlet kina *ledger*.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifin, S., W. Astika., K. Bambang., Z.S. Wibowo., Sukasmono, W.S. Kartawijaya., J. Santoso., W. Widayat., B. Sriyadi., I. S. Arifin., Y. Rachmiati., A. M. Sabur., Suhargyanto, S. Adimulyo., Topani, B. Samudi. 1995. *Petunjuk Kultur Teknis Tanaman Kina*. BPTK Bandung. 143 hal
- Arteca, R.N. 1996. *Plant Growth Substance : Principles and Applications*. Chaptman and hall. New York. 332 p.
- Astika, W. dan S. Adimulyo. 1977. Pemuliaan ke Arah Klon-Klon Kina yang Berkadar Kinida Tinggi, Simposium Kina II. Balai Penelitian Teh dan Kina. Gambung. *Berita Biologi* 4 (4) : 175-181.
- Cassells, A.C. and R.F. Curry. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture : implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue Culture*. 64: 145-157.
- Davies, P.J. 1995. *The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence and Function*. Dalam: Davies, P.J. editor. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Ed ke-2. Dordrech: Kluwer Academic Pub, p.1-2
- Dayrit F.M., Guidotea A., Generalao M.L., Serna C. 1994. Determination of the quinine content in the bark of the cinchona tree grown in Mt. Kitangland. Bukidnon. *Phillip. J. Sci.* 123 (3): 25-227.
- Dodds, J.H. and L.W Roberts. 1995. *Experiments in Plant Tissue Culture* 3rd edition. Cambridge University Press. UK. 190 hal.
- Dwidjoseputro, 1990. *Pengantar Fisiologi Tumbuhan*. Jakarta : Gramedia. 177 hal
- Ettling, C. 2006. *Budidaya Tanaman Kina*. Pusat Penelitian Teh dan Kina Bandung.
- George, E. P. And P. D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegenics Limited, New York.
- Groothoff, A. 2006. *Eksplorasi Rasional Perkebunan Kina*. PPTK Bandung. 91 hal
- Gunawan, L, W, 1988, *Teknik Kultur Jaringan, Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan*. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor. 304 hal.
- 1992. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Pusat antar Universitas, Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Hartman, H.T, D.E. Kester and F.T. Davies. 1990. *Plant Propagation Princip and Practices*. Fifth Edition. Prentice-Hall Intl., Inc. Philines. 521 p.
- Heddy, S. 1996. *Hormon Tumbuhan*. Jakarta : PT. Raja Grafindo Persada. 97 hal
- Hendaryono, D.P.S dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Kanisius : Yogyakarta

- Hoesen, D. S. H. 1998. Kultur Jaringan Kunir Putih (*Kaempferia rotunda* L).
- Hunter, C.S. 1988. Cinchona spp, Micropropagation and the *In Vitro* Production of Quinine and Quinidine. In y.p.s. Bajaj (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 4. Medical and Aromatic Plants 1. Berlin, Springer. Verlag
- Kieber, J. and I.B.D'Agostino. 2002. Molecular mechanisms of cytokinin action. *Plant Biology* 1999, 2:359–364. Department of Biological Sciences. Chicago
- Krikorian, A.D.M., Singh and C.E. Quina. 1982. Aceptic Micropropagation of Cinchona : Prospects and problems in A.N. Rao (ed). Tissue Culture of Economically Important Plants. Proc.Int'l. Symp, Nation University of Singapore, 28-30 April 1981.
- Kusman, M. 1983. Gagasan Strategis Perdagangan Komoditi Kina. Warta BPTK 9 (3/4) : 151-161
- Lakitan, B. 1996. Fisiologi Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman. Jakarta : PT Raja Grafindo Persada. 218 hal
- Lestari, E.G., D. Seswita., I. Mariska. 1991. Pengaruh Beberapa Zat Pengatur Tumbuh Sitokinin (BA, Kinetin dan 2-iP) pada Perbanyakan Mikro Tanaman Rami. Poster 5-376. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri.
- _____. 2008. Kultur Jaringan. Akademia : Bogor
- _____. 2012. Regenerasi Tanaman secara *In Vitro* dan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi. <http://biogen.litbang.deptan.go.id> (Diakses pada 28 April 2014)
- Madjid, R. 1975. Situasi dan Pengembangan Kina di Sumatera Barat. Warta BPTK
- Maudy dan Risma. 1992. Mengenal Tanaman Kina. Trubus No 269 Th XXIII. Hal 24-25
- Pierik, R.L.M. 1987. *In Vitro* Culture of Hinger Plant. Martinus Nijhhoft Publisher. Netherland
- Prawiranata, W., H. Said dan T. Pin. 1981. Dasar-Dasar Fisiologi Tumbuhan. Departemen Botani Fakultas Pertanian Bogor, Bogor
- Purwaningsih, T. 2003. Pengaruh BAP terhadap Penggandaan Tunas dan Kestabila Genetik Tunas *In Vitro* Tanaman Kina. [Tesis]. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 68 hal
- Purwanto, A. 2008. Kajian Macam Eksplan dan Konsentrasi IBA terhadap Multiplikasi Tanaman Manggis (*Garcinia mangostana* L) Secara *In Vitro*. [Skripsi]. Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Qosim, W.A., R. Poerwanto., G.A. Wattimena dan Witjaksono. 2005. Pembentukan Planlet Manggis Dari Kalus Nodular *In Vitro*. *Zuriat*, Vol. 16, No. 2. Bogor

- Rahardja, dan W. Wiryanta. 2003. Aneka Cara Memperbanyak Tanaman. Agromedia Pustaka: Jakarta.
- Rani, V. dan S.N Raina. 2000. Genetic Fidelity of Organized Meristem-Derived Micropropagated Plants: a critical Reappraisal. *In Vitro Cell dev Biol.* 36: 23 19-330.
- Riyadi, I. dan J.S Tahardi. 2005. Pengaruh NAA dan IBA terhadap pertumbuhan dan perkembangan Tunas Kina (*Cinchona succirubra*). Jurnal Bioteknologi Pertanian. Vol.10 No.2. pp 45-50
- 2009. Perbanyak In Vitro Tanaman Kina (*Cinchona ledgeriana* Moens) melalui Tunas Aksilar dan Apikal. Menara Perkebunan. 77 (1), 36-46.
- Rosyadi, I. 2013. Indonesia Raja Kina. <http://disbun.jabarprov.go.id> (Diakses 22 Oktober 2013)
- Santoso, J., N.R. Mathius., U. Sastraprawira., G. Suryatmana., D. Saodah. 2004. Perbanyak Tanaman Kina *Cinchona ledgeriana* Moens dan *C. succirubra* Pavon Melalui Penggandaan Tunas Aksiler. Jurnal Menara Perkebunan 72(1) 11-27.
- Santoso, T. B. 2013. Produksi Garam Kina Ditingkatkan. PT. Perkebunan Nusantara VIII (Persero). <http://www.pn8.co.id> (Diakses pada tanggal 30 April 2013).
- Santoso, U. dan F. Nursandi. 2004. Kultur Jaringan Tanaman. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang
- Sukasmono. 1988. Tuntunan Budidaya Kina. Balai Penelitian Teh dan Kina. Gambung. 70 p.
- Syahid, S.F., Natalini, N.K. 2007. Induksi dan Regenerasi Kalus Keladi Tikus (*Typonium Flagelliforme* Lodd) Secara *In Vitro*. Jurnal Littri Vol 13 No 4 hal 142-146. Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik.
- Tang, W. and R.J. Newton. 2004. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). Plant Sci. 167(3):621-628.
- Torres, K. C. 1989. Culture Techniques for Horticultural Crops. Chapman and Hall. New York.
- Wattimena, G. A. 1988. Zat Pengatur Tumbuh. Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor. 145 hal.
- Gunawan, L.W., Mattjik, Samsudin, Wiendi, N.A dan Ernieati. 1992. Bioteknologi Tanaman. Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Wenas, M. 2003. Pengaruh Beberapa Konsentrasi NAA dan BAP terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Tunas Pucuk Gambir (*Uncaria gambir* Roxb) secara *In Vitro*. [Skripsi]. Padang. Fakultas Pertanian. Universitas Andalas
- Werbrouds, S.P.O. and P.C. Deberg. 1993. Applied Aspect of Plant Regeneration

- Wetherell, D.F. 1982. Pengantar Propagasi Tanaman Secara *In Vitro*. Avery Pub. Group, Inc., New Jersey. 110 p
- Wibowo, Z.S., J. Santoso dan Sukasmono. 1990. Pengaruh Panjang Bahan setek dan Kadar Rootone-F terhadap Pertumbuhan Setek Kina (*Cinchona ledgeriana* Moens) klon QRC. Warta Teh dan Kina. 1: 49-54
- Yusnita. 2003. Kultur jaringan. Cara memperbanyak tanaman secara efisien. Jakarta : Agro Media

LAMPIRAN

Lampiran 1. Jadwal Kegiatan

[illegible]

Lampiran 2. Komposisi Media Basal *Murashige and Skoog* (MS)

Stok	Komposisi	Konsentrasi dalam media (mg/L)
A	NH_4NO_3	1650
B	KNO_3	1900
C	KH_2PO_4	170
	H_3BO_3	6,2
	Na_2MoO_3	0,25
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
	KI	0,83
D	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
E	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,9
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	8,6
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
F	Na_2EDTA	37,3
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,78
Vitamin	Tiamin-HCl	0,1
	Asam nikotinat	0,5
	Piridoksin-HCl	0,5
	Glycine	2
	Myo-inositol	10

Sumber : Gunawan (1988)

Keterangan

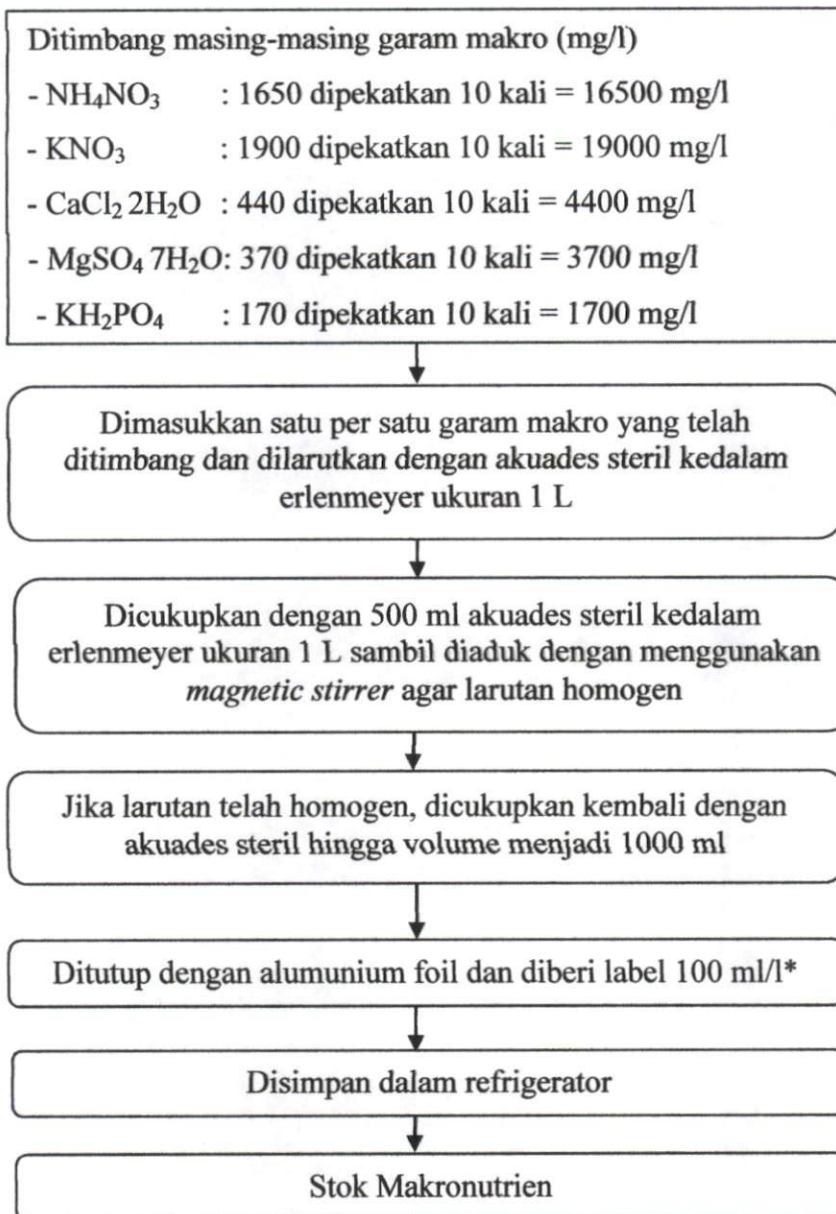
Agar : 8 g/l

Sukrosa : 30 g/l

pH : 5,8

Lampiran 3. Pembuatan Larutan Stok Media MS

A. Stok Makronutrien

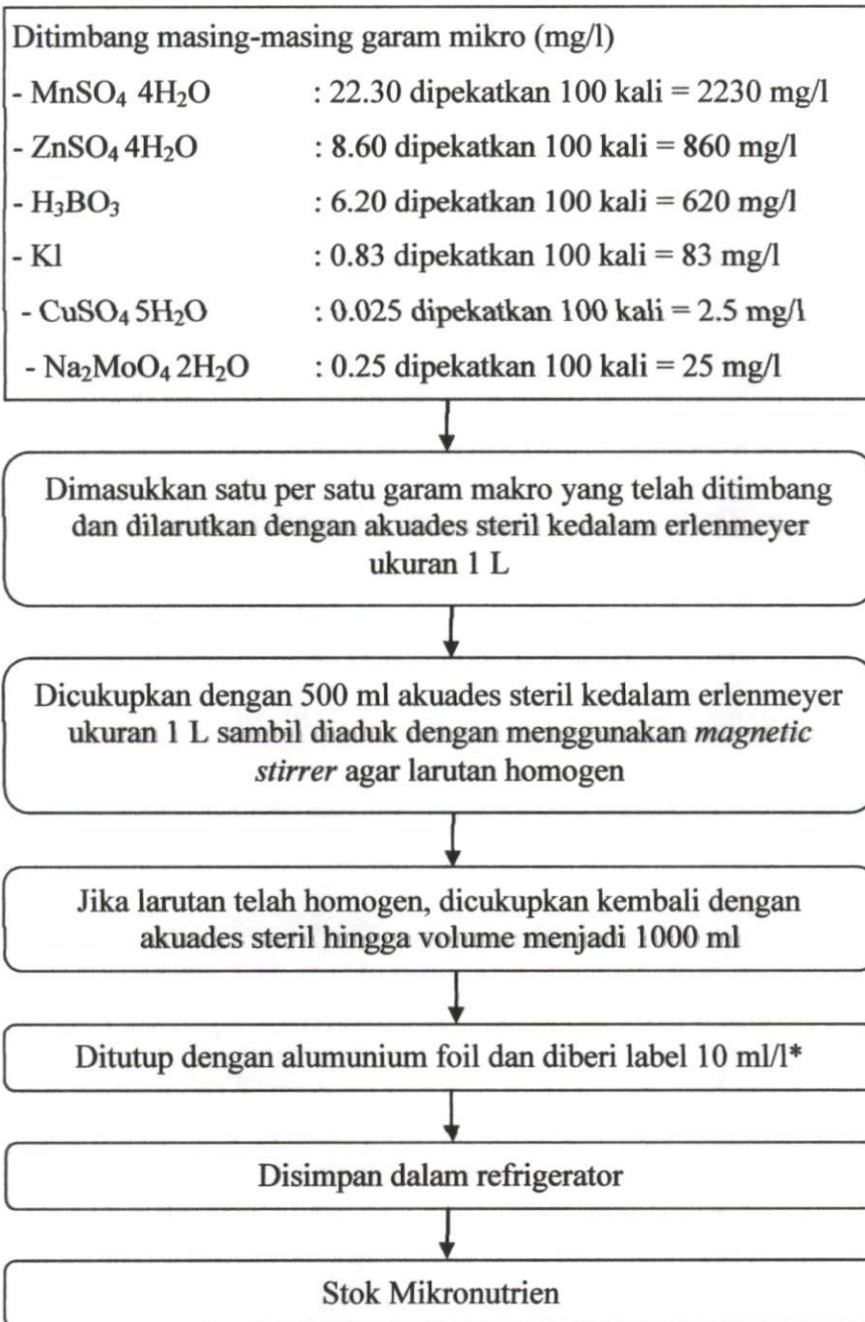


Catatan:

*) 100 ml/l larutan stok makronutrien yang dipipet dalam 1 liter media MS diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{volume stok yang dibuat}}{\text{kepekatan (10 kali)}} \\
 &= \frac{1000 \text{ ml}}{10} \\
 &= 100 \text{ ml/l}
 \end{aligned}$$

B. Stok Mikronutrien

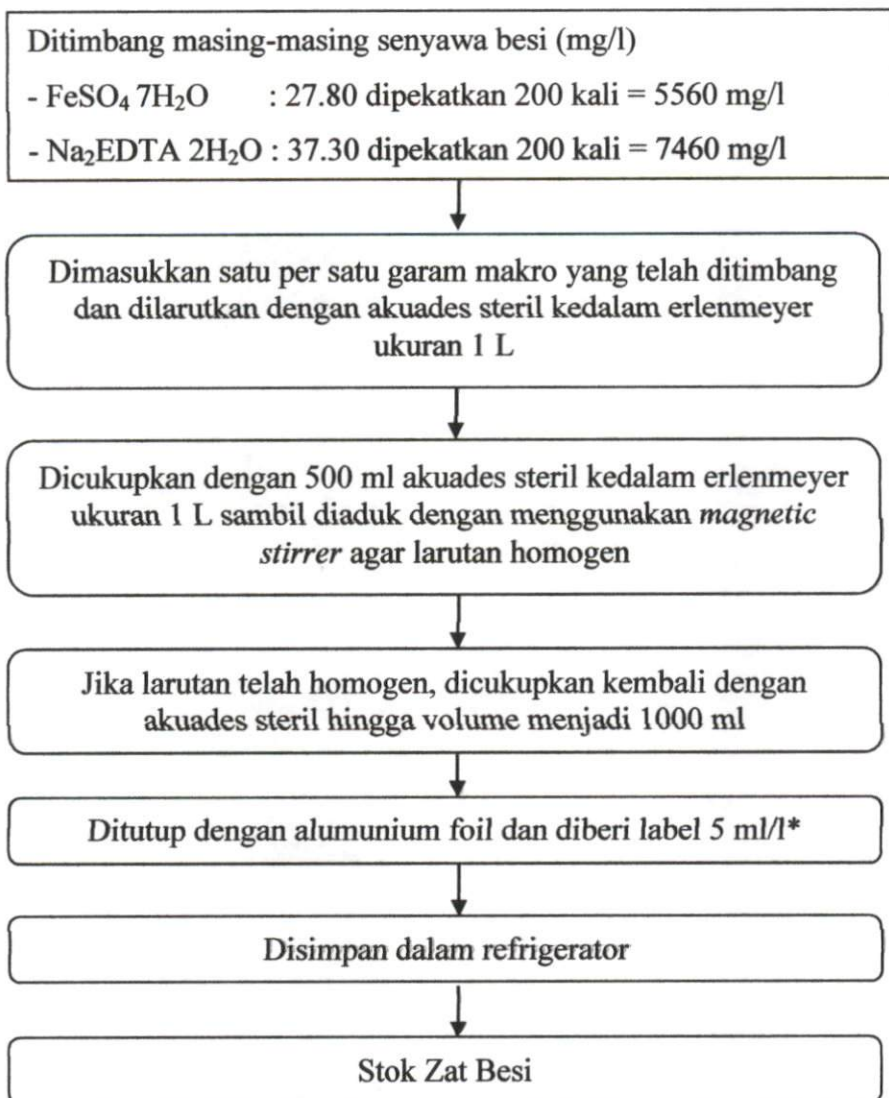


Catatan:

*) 10 ml/l larutan stok mikronutrien yang dipipet dalam 1 liter media MS diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{volume stok yang dibuat}}{\text{kepekatan (100 kali)}} \\
 &= \frac{1000 \text{ ml}}{100} \\
 &= 10 \text{ ml/l}
 \end{aligned}$$

C. Stok Zat Besi

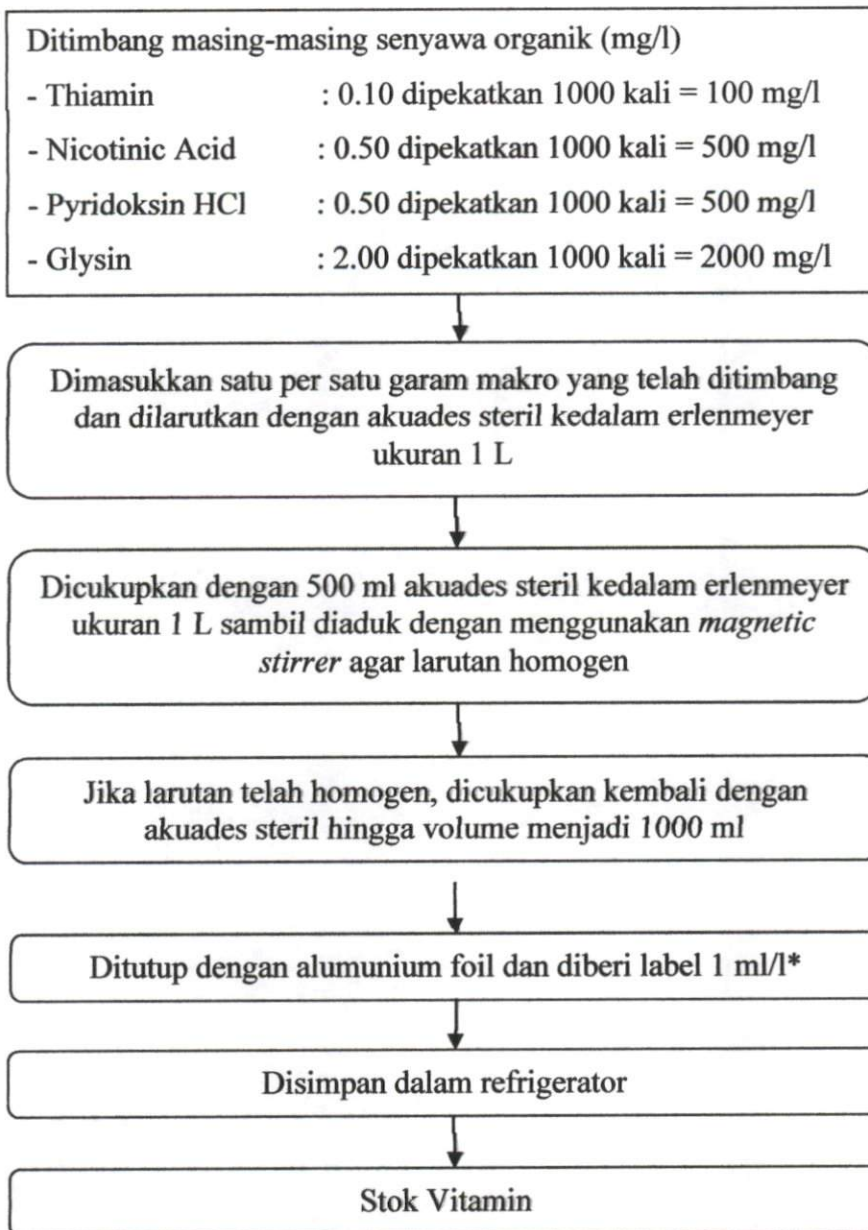


Catatan:

*) 5 ml/l larutan stok zat besi yang dipipet dalam 1 liter media MS diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{volume stok yang dibuat}}{\text{kepekatan (200 kali)}} \\
 &= \frac{1000 \text{ ml}}{200} \\
 &= 5 \text{ ml/l}
 \end{aligned}$$

D. Stok Vitamin



Catatan:

*) 1000 ml/l larutan stok vitamin yang dipipet dalam 1 liter media MS diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{volume stok yang dibuat}}{\text{kepekatan (1000 kali)}} \\
 &= \frac{1000 \text{ ml}}{1000} \\
 &= 1 \text{ ml/l}
 \end{aligned}$$

Lampiran 4. Perhitungan ZPT (Zat Pengatur Tumbuh)

A. Zat Pengatur Tumbuh BAP

Stok yang tersedia = 1000 ppm

1. Cara pembuatan stok BAP

Untuk volume larutan stok BAP 1000 ppm yang akan dibuat adalah 100 ml.

BAP 1000 ppm = 1000 mg/l

$$\frac{n_1}{v_1} = \frac{n_2}{v_2}$$

$$\frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{n_2}{100 \text{ ml}}$$

$$n_2 = \frac{100000}{1000}$$

$$n_2 = 100 \text{ mg}$$

Jadi untuk membuat BAP 1000 ppm adalah dengan menimbang BAP sebanyak 100 mg dan dicukupkan kedalam 100 ml akuades.

2. Jumlah BAP yang dipipet pada larutan stok BAP 1000 ppm adalah :

Untuk perlakuan BAP 3 mg/l

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$500 \text{ ml} \times 3 \text{ mg/l} = V_2 \times 1000 \text{ mg/l}$$

$$V_2 = \frac{1500}{1000} = 1,5 \text{ ml}$$

B. Zat Pengatur Tumbuh Kinetin

Stok yang tersedia = 1000 ppm

1. Cara pembuatan stok kinetin

Untuk volume larutan stok kinetin 1000 ppm yang akan dibuat adalah 100 ml.

Kinetin 1000 ppm = 1000 mg/l

$$\frac{n_1}{v_1} = \frac{n_2}{v_2}$$

$$\frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{n_2}{100 \text{ ml}}$$

$$n_2 = \frac{100000}{1000}$$

$$n_2 = 100 \text{ mg}$$

Jadi untuk membuat larutan stok kinetin 1000 ppm adalah dengan menimbang kinetin sebanyak 100 mg dan dicukupkan kedalam 100 ml akuades.

2. Jumlah kinetin yang dipipet pada larutan stok kinetin 1000 ppm adalah :

- Untuk perlakuan 0,5 mg/l

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$500 \text{ ml} \times 0,5 \text{ mg/l} = V_2 \times 1000 \text{ mg/l}$$

$$V_2 = \frac{250}{1000} = 0,25 \text{ ml}$$

- Untuk perlakuan 1 mg/l

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$500 \text{ ml} \times 1 \text{ mg/l} = V_2 \times 1000 \text{ mg/l}$$

$$V_2 = \frac{500}{1000} = 0,5 \text{ ml}$$

- Untuk perlakuan 1,5 mg/l

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$500 \text{ ml} \times 1,5 \text{ mg/l} = V_2 \times 1000 \text{ mg/l}$$

$$V_2 = \frac{750}{1000} = 0,75 \text{ ml}$$

- Untuk perlakuan 2 mg/l

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$500 \text{ ml} \times 2 \text{ mg/l} = V_2 \times 1000 \text{ mg/l}$$

$$V_2 = \frac{1000}{1000} = 1 \text{ ml}$$

Keterangan :

n1 = berat stok yang diketahui (mg)

n2 = berat stok yang akan dibuat/dicari (mg)

v1 = volume stok yang diketahui (ml)

v2 = volume stok yang akan dibuat (ml)

N1 = konsentrasi yang diinginkan (mg/l)

N2 = konsentrasi stok yang tersedia (mg/l)

V1 = volume media yang akan dibuat (ml)

V2 = volume stok yang akan dipipet (ml)

Lampiran 5. Denah Penempatan Botol Kultur di Laboratorium menurut RAL

B ^I ***	C ^I ***	C ^{III} ***	A ^{II} ***	B ^{III} ***
B ^{IV} ***	D ^I ***	A ^{III} ***	C ^{II} ***	D ^{IV} ***
E ^I ***	A ^I ***	E ^{III} ***	A ^{IV} ***	E ^{II} ***
D ^{III} ***	B ^{II} ***	C ^{IV} ***	D ^{II} ***	E ^{IV} ***

Keterangan :

- A, B,C,D

I, II, III, IV

- = Perlakuan

= Ulangan

= Botol Kultur

Lampiran 6. Tabel analisis ragam beberapa pengamatan

a. Persentase Eksplan yang Hidup (%)

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5 %
Perlakuan	4	2.555,91	638,878	1,33 ^{tn}	3,06
Sisa	15	7.222,44	481,496		
Total	19	9.777,96			

^{tn} = tidak berbeda nyata

b. Saat Muncul Tunas (HST)

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5 %
Perlakuan	4	138,14	34,54	22 [*]	3,06
Sisa	15	23,48	1,57		
Total	19	161,42			

^{*} = berbeda nyata

c. Persentase Eksplan yang Membentuk Tunas

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5 %
Perlakuan	4	2.555,91	638,878	1,33 ^{tn}	3,06
Sisa	15	7.222,44	481,496		
Total	19	9.777,96			

^{tn} = tidak berbeda nyata

d. Jumlah Tunas per Eksplan

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5 %
Perlakuan	4	0,6649	0,1662	9,61 [*]	3,06
Sisa	15	0,2593	0,0173		
Total	19	0,9242			

^{*} = berbeda nyata

e. Tinggi Tunas

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5 %
Perlakuan	4	15,94	3,99	16,63*	3,06
Sisa	15	3,58	0,24		
Total	19	19,52			

* = berbeda nyata

f. Jumlah Daun (helaian)

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5 %
Perlakuan	4	0,3482	0,08705	3,86 *	3,06
Sisa	15	0,3387	0,02258		
Total	19	0,6869			

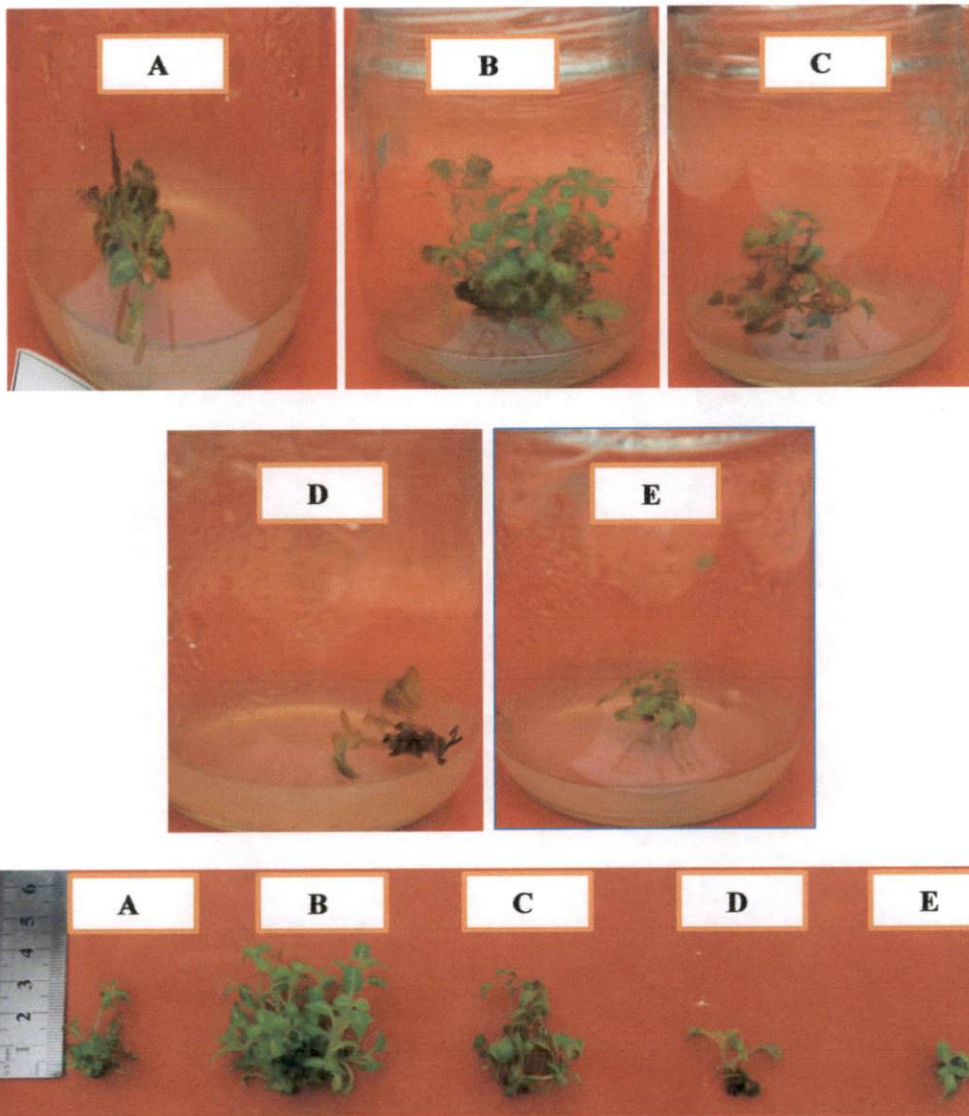
* = berbeda nyata

g. Bobot Segar Shootlet (gr)

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5 %
Perlakuan	4	0,240	0,06	5,83*	3,06
Sisa	15	0,154	0,0103		
Total	19	0,394			

* = berbeda nyata

Lampiran 7. Dokumentasi hasil percobaan



Gambar 1. Penampilan pertumbuhan tanaman kina *ledger* secara *in vitro* pada perlakuan A (BAP 3 mg/L + kinetin 0 mg/L), B (BAP 3 mg/L + kinetin 0,5 mg/L), C (BAP 3 mg/L + kinetin 1 mg/L), D (BAP 3 mg/L + kinetin 1,5 mg/L), E (BAP 3 mg/L + kinetin 2 mg/L) umur 12 MST

Lampiran 8. Karakteristik Tanaman Kina *Ledger* (*Cinchona ledgeriana* Moens)

Klasifikasi

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Rubiales
Suku	: Rubiaceae
Genus	: Cinchona
Spesies	: <i>Cinchona ledgeriana</i> Moens

Deskripsi

Tinggi pohon antara 4-10 m, bercabang mulai dekat dengan permukaan tanah. Cabang bentuk segi empat, sudut antara cabang dan batang pokok sangat tajam. Daun elip sampai lanset, bagian pangkal lancip dan tirus, ujung daun lancip dan jorong, helaian tipis, berwarna ungu terang tetapi daun muda berwarna kemerahan, tangkai daun tidak berbulu, berwarna hijau atau kemerahan, panjang tangkai 3-6 mm. Ukuran panjang daun 25,5-28,5 cm, lebar 9-13 cm. mahkota bunga berwarna kuning agak puti dan berbau wangi, bentuk melengkung dengan ukuran panjang 8-12 mm. Kelopak bunga bentuk limas sungsang 3-4 mm, tabung tebal ditutupi bulu berwarna putih, tabung mahkota bunga bagian luarnya berbulu pendek tapi bagian dalamnya gundul dengan 5 sudut. Tangkai sari tidak ada. Buah lanset sampai bulat telur dengan ukuran panjang 8-12 mm dan lebar 3-4 mm. Biji lonjong sampai lanset panjang 4-5 mm.

Sumber : Arifin *et al* (1995)

Lampiran 9. Jumlah tunas yang terbentuk umur 4 minggu, 8 minggu dan 12 minggu setelah tanam pada pemberian BAP dengan beberapa konsentrasi kinetin

Perlakuan	Jumlah tunas (buah)		
	Persentase peningkatan (%)		
	4 MST	8 MST	12 MST
A (BAP 3 mg/l + kinetin 0 mg/l)	3,00	5,80	9,79
% dari minggu sebelumnya	0,00	93,33	68,79
B (BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l)	3,67	7,58	15,42
% dari minggu sebelumnya	0,00	106,54	103,43
C (BAP 3 mg/l + kinetin 1 mg/l)	3,25	6,00	10,50
% dari minggu sebelumnya	0,00	84,62	75,00
D (BAP 3 mg/l + kinetin 1,5 mg/l)	2,33	3,84	5,46
% dari minggu sebelumnya	0,00	64,81	42,19
E (BAP 3 mg/l + kinetin 2 mg/l)	1,83	3,04	4,54
% dari minggu sebelumnya	0,00	66,12	49,34

Lampiran 10. Tinggi tunas yang terbentuk umur 4 minggu, 8 minggu dan 12 minggu setelah tanam pada pemberian BAP dengan beberapa konsentrasi kinetin

Perlakuan	Tinggi tunas (cm)		
	Persentase peningkatan (%)		
	4 MST	8 MST	12 MST
A (BAP 3 mg/l + kinetin 0 mg/l)	0,42	0,87	1,44
% dari minggu sebelumnya	0,00	107,14	65,52
B (BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l)	1,45	2,19	3,25
% dari minggu sebelumnya	0,00	51,03	48,40
C (BAP 3 mg/l + kinetin 1 mg/l)	0,93	1,56	2,42
% dari minggu sebelumnya	0,00	67,74	55,13
D (BAP 3 mg/l + kinetin 1,5 mg/l)	0,18	0,61	1,02
% dari minggu sebelumnya	0,00	238,89	67,21
E (BAP 3 mg/l + kinetin 2 mg/l)	0,16	0,46	0,93
% dari minggu sebelumnya	0,00	187,50	102,17

Lampiran 11. Jumlah daun yang terbentuk umur 4 minggu, 8 minggu dan 12 minggu setelah tanam pada pemberian BAP dengan beberapa konsentrasi kinetin

Perlakuan	Jumlah daun (helai)		
	Persentase peningkatan (%)		
	4 MST	8 MST	12 MST
A (BAP 3 mg/l + kinetin 0 mg/l)	8,42	23,54	39,75
% dari minggu sebelumnya	0,00	179,57	68,86
B (BAP 3 mg/l + kinetin 0,5 mg/l)	10,83	36,50	61,75
% dari minggu sebelumnya	0,00	237,03	69,18
C (BAP 3 mg/l + kinetin 1 mg/l)	10,75	32,83	50,75
% dari minggu sebelumnya	0,00	205,39	54,58
D (BAP 3 mg/l + kinetin 1,5 mg/l)	7,00	17,42	30,04
% dari minggu sebelumnya	0,00	148,86	72,45
E (BAP 3 mg/l + kinetin 2 mg/l)	5,58	15,50	26,00
% dari minggu sebelumnya	0,00	177,78	67,74